

**Liposomale Verkapselung von Lidocain-HCl und Prilocain-HCl  
zur intravenösen Anwendung**

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n**

von Markus Müller

aus Bad Karlshafen

1. Referentin: Professor Dr. Christel Müller-Goymann  
2. Referent: Professor Dr. Rolf Daniels  
Eingereicht am: 18.02.2008  
Mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.09.2008

Druckjahr 2008

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Frau Prof. Dr. Müller-Goymann, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Müller M., Mackeben S., Müller-Goymann C.C., Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics, Int. J. Pharm. 274, S.139-148 (2004)

### **Tagungsbeiträge**

Müller M., Müller-Goymann C.C., Lidocaine-HCl and prilocaine-HCl encapsulation in liposomes, (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 05.-07. Oktober 2000, Münster

Müller M., Müller-Goymann C.C., Influence of temperature on the manufacturing of liposomes, (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 10.-13. Oktober 2001, Halle/Saale

Müller M., Mackeben S., Müller-Goymann C.C., Vergleich der Eigenschaften von beladenen und unbeladenen Liposomen, (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 09.-12. Oktober 2002, Berlin

Für meine Familie und meine Mutter († 2004)

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C.C.Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. R. Daniels danke ich für Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit sowie für die hilfreiche Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Harms für die Unterstützung bei den Langmuir-Messungen und Herrn Dr. Mackeben für die Durchführung der Röntgenkleinwinkelmessungen.

Frau K. Stempel danke ich für die Unterstützung bei den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dem Institut für organische Chemie gilt mein Dank für die Durchführung der NMR-Untersuchungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei den im Abschnitt 3.1 aufgeführten Firmen für die freundliche Überlassung von Untersuchungsmaterialien.

Für geschützte Namen werden nicht durchgängig Kennzeichnungen verwendet.

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>2</b>
	<b>2.1 Arzneistoffe</b>	<b>2</b>
2.1.1	Lokalanästhetika	2
2.1.1.1	Lidocain	5
2.1.1.2	Prilocain	7
2.1.2	Propofol	8
	<b>2.2 Phospholipide am Beispiel des Lecithins</b>	<b>12</b>
	<b>2.3 Amphiphile Moleküle</b>	<b>15</b>
	<b>2.4 Assoziationskolloide in wässriger Lösung</b>	<b>16</b>
	<b>2.5 Liposomen</b>	<b>19</b>
2.5.1	Entstehung und Systematik von Liposomen	21
2.5.2	Vesikel mit mehreren Lamellen	23
2.5.3	Vesikel mit einer Lamelle	24
2.5.3.1	Herstellung unilamellarer kleiner Vesikel (SUV)	25
2.5.3.2	Unilamellare große Vesikel (LUV) und ihre Herstellung	27
2.5.4	Qualitätssicherung bzw. Qualitätskontrolle der Liposomen	28
2.5.5	Beladung der Liposomen	32
2.5.6	Stabilität der Liposomen	32
2.5.7	Freisetzung aus Liposomen	36
2.5.8	Lagerstabilität	36
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
	<b>3.1 Material</b>	<b>37</b>
3.1.1	Arzneistoffe	37
3.1.1.1	Lidocain-Hydrochlorid	37
3.1.1.2	Xylocain® 2 %	37
3.1.1.3	Prilocain-Hydrochlorid	37
3.1.1.4	Xylonest® 1 %	37
3.1.1.5	Propofol-Emulsion	38

3.1.2	Hilfsstoffe	39
	3.1.2.1 Phospholipon <sup>®</sup> 90 G (Lecithin)	39
3.1.3	Wasser	39
<b>3.2 Methoden</b>		40
3.2.1	Herstellung der Proben	40
	3.2.1.1 Herstellung arzneistofffreier Liposomen	40
	3.2.1.2 Herstellung arzneistoffhaltiger Liposomen	40
3.2.2	Mischungen der Fertigarzneimittel	40
3.2.3	Freeze-Dried Empty Liposomes (FDEL) Methode (Rehydratation gefriergetrockneter Leerliposomen)	41
3.2.4	Phosphatbestimmung	41
3.2.5	Mikroskopische Methoden	42
	3.2.5.1 Polarisationsmikroskopie	42
	3.2.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	42
3.2.6	Dynamische Differenzkalorimetrie	42
3.2.7	Partikelgrößenbestimmungen	43
	3.2.7.1 Photonenkorrelationsspektroskopie	43
	3.2.7.2 LS 13 320	44
.2.8	Röntgenmessungen	45
.2.9	Messungen des zeta-Potentials	45
3.2.10	Spektroskopische Methoden	46
	3.2.10.1 NMR-Spektroskopie	46
	3.2.10.2 Infrarot-Spektroskopie	47
3.2.11	Fluoreszenzmessungen	47
	3.2.11.1 Verwendung von 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS)	47
	3.2.11.1.1 Bestimmung der Arzneistoffbindung im hydrophilen Bereich	47
	3.2.11.1.2 Detektion von Interaktion mittels des Fluoreszenz- farbstoffs 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS)	48
	3.2.11.2 Verwendung von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	49
	3.2.11.2.1 Bestimmung der Arzneistoffbindung im hydrophilen Bereich	49
	3.2.11.2.2 Untersuchung zum Assoziationsvermögen von Lokalanästhetika mittels des Fluoreszenzfarbstoffs 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	49

3.2.12	Bestimmung der Oberflächenspannung	50
	3.2.12.1 Ring-Tensiometer	50
	3.2.12.2 Stalagmometer	50
3.2.13	Solubilisationsuntersuchungen	51
3.2.14	Bestimmung des Arzneistoffbeladungsgrads von liposomalen Systemen	51
3.2.15	UV/VIS-Spektroskopie	52
	3.2.16 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	53
	3.2.17 Lagerungsversuche	53
	3.2.18 Viskosimetrie	54
3.2.19	Messungen am Langmuir-Blodgett Film	54
<b>4. Versuchsergebnisse und Ergebnisse</b>		<b>55</b>
<b>4.1 Ergebnisse mit den Handelsprodukten</b>		<b>55</b>
<b>4.2 Beschreibung der Lokalanästhetika</b>		<b>63</b>
	4.2.1 Messung der Oberflächenspannung	64
	4.2.2 Untersuchung auf Assoziatbildung	64
<b>4.3 Herstellung und Charakterisierung von Liposomdispersionen</b>		<b>70</b>
4.3.1	Wahl der Herstellungsmethode	70
4.3.2	Wahl der Lecithinmenge	70
4.3.3	Variation der Herstellungsbedingungen	71
4.3.4	Beladung der Liposomen	77
4.3.5	Lokalisation des Lokalanästhetikums	79
	4.3.5.1 Fluoreszenz Untersuchungen	79
	a) Bestimmung der Arzneistoffbindung im hydrophilen Bereich	
	b) Bestimmung der Arzneistoffbindung im lipophilen Bereich	
	4.3.5.2 Dynamische Differentialkalorimetrie (DSC) von arzneistoffbeladenen Liposomendispersionen	81



4.3.6	Wechselwirkungen zwischen Lecithin und dem Lokalanästhetikum	82
	4.3.6.1 Kernresonanzspektroskopie	82
	4.3.6.2 Langmuir-Blodgett-Trog	86
	4.3.6.3 Infrarot-Spektroskopie	92
	4.3.6.4 Fluoreszenzuntersuchungen	92
4.3.7	Bestimmung der Doppelschichtdicke unilamellarer Liposomen, des Interlamellarabstands oligo- bzw. multilamellarer Liposomen sowie der Lamellenzahl durch Röntgenuntersuchungen (SAXS)	93
4.3.8	Messungen des Zetapotentials	97
4.3.9	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen	97
4.3.10	Lagerung	100
4.3.11	Gefriertrocknung	105
1.	Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der verkapselten Lokalanästhetikamenge (Charakterisierung des Verfahrens und erste Messwerte)	106
<b>4.4</b>	<b>Erhöhung der Arzneistoffmenge pro Probenvolumen</b>	<b>110</b>
.4.1	Testung alternativer Methoden zur Herstellung arzneistoff-beladener Liposomen	110
4.4.2	Lagerungsstabilität	115
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>Ansätze der Vermeidung des Injektionsschmerzes einer Propofol-Emulsion</b>	<b>121</b>
-	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>141</b>

---

## 1. Einleitung und Problemstellung

Bei der Verwendung von Propofol-O/W-Fettemulsionen zur Injektionsnarkose treten Injektionsschmerzen auf [1, 2]. Um diese zu vermeiden, sind unterschiedliche Maßnahmen getestet worden [3]. Da sich die Verwendung eines Lokalanästhetikums im Vergleich zu anderen Maßnahmen als beste Alternative erwiesen hat [4-6], wird am häufigsten ein Lokalanästhetikum separat verabreicht bzw. der Emulsion kurz vor deren Verabreichung zugesetzt [7-10]. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls untersucht, ob die Verabreichung des Lokalanästhetikums vor oder gemischt mit der Propofol-Emulsion, und die intravenöse oder epidurale Applikation von Vorteil ist [11].

Ein Krankenhausapotheker warf die Frage auf, ob das in der Packungsbeilage empfohlene Lokalanästhetikum Lidocain durch das ebenfalls zum Amid-Typ gehörige Lokalanästhetikum Prilocain ersetzt werden kann. Bei dem Zusatz von Prilocain-HCl anstelle von Lidocain-HCl zur Propofol-O/W-Fettemulsionen wurde eine Interaktion beobachtet [12]. Die Interaktion machte sich in einem Brechen der Emulsion bemerkbar, welches durch das Aufrahmen koaleszierter Tröpfchen der Fettphase erkennbar war. Als Grund für die Interaktion wurde von Krauel und Kaufke die Wechselwirkung des Lokalanästhetikums mit dem Emulgator der Fettemulsion angenommen. Um diese Interaktion zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit der Ansatz gewählt, Lokalanästhetikum und emulgierte Tröpfchen räumlich zu trennen. Dazu sollte das Lokalanästhetikum in Liposomen aus Lecithin inkorporiert werden. Liposomen sind in der Literatur umfassend beschrieben [13] und wirken im Körper wegen der großen Ähnlichkeit zu zellulären Membranen nicht immunogen. Lecithin hat den Vorteil, dass es bioabbaubar und untoxisch ist. Wegen ihrer ausgeprägten Biokompatibilität sind Lecithinliposomen schon früh für die intravenöse Gabe in Betracht gezogen worden [14].

---

## 2. Allgemeiner Teil

### 2.1 Arzneistoffe

#### 2.1.1 Lokalanästhetika

Lokalanästhetika sind Substanzen zur lokalen Schmerzausschaltung bei nur geringer Beeinträchtigung des zentralen Nervensystems. Ihre Wirkungsweise beruht im Wesentlichen darauf, dass sie durch eine chemische Reaktion die Signalweiterleitung unterbinden. Der molekulare Wirkmechanismus kann anhand von drei generellen Theorien beschrieben werden:

5. Störung der Beweglichkeit, des Oberflächenbereiches, des Oberflächenpotentials und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung der Lipide in der Zellmembran
6. Direkte Interaktion mit Proteinen, welche die Transmembranionenkanäle bilden
7. Konformationale Änderung der Proteine, welche die Ionenkanäle bilden [15]

Die molekulare Struktur lässt den amphiphilen Charakter der Lokalanästhetika erkennen. Sie enthält beides, sowohl hydrophile als auch hydrophobe Anteile, welche durch eine Ester- oder Amidbindung voneinander getrennt sind.

Nach den zwei meist verwendeten Systematiken erfolgt die Einteilung der Lokalanästhetika entweder anhand der chemischen Strukturformel im hydrophoben Teil oder der Art der Bindung, die den hydrophilen und hydrophoben Teil voneinander trennt.

Die erste Systematik folgt der Einteilung der Lokalanästhetika nach Arias [16]. Dieser teilt die Lokalanästhetika abhängig von der Anzahl und Art der aromatischen Ringe in drei Hauptgruppen ein:

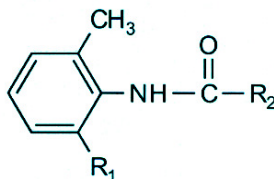
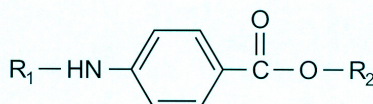
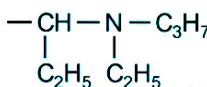
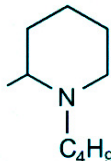
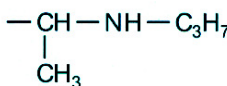
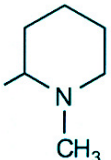
Gruppe I: Lokalanästhetika, die nur einen aromatischen Ring besitzen

Gruppe II: Lokalanästhetika, die zwei getrennte aromatische Ringe aufweisen

Gruppe III: Lokalanästhetika, deren hydrophober Anteil durch eine Isochinolingruppe gebildet wird

Demgemäß gehören sowohl Lidocain als auch Prilocain zu Gruppe I.

Die zweite Systematik unterteilt die Lokalanästhetika nach ihrer Bindung: in Lokalanästhetika vom Ester-Typ z.B. Benzocain und vom Amid-Typ z.B. Lidocain und Prilocain (Abbildung 2.1).

					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Etidocain	-CH <sub>3</sub>		Benzocain	-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Bupivacain	-CH <sub>3</sub>		Procain	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
Butanilicain	-Cl	-CH <sub>2</sub> -NH-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Tetracain	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Lidocain	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>			
Prilocain	-H				
Mepivacain	-CH <sub>3</sub>				

Lokalanästhetika vom Amid-Typ

Lokalanästhetika vom Ester-Typ

Abbildung 2.1 Unterscheidung der Lokalanästhetika nach Ester-Typ und Amid-Typ nach [17]

Da die beiden, in dieser Arbeit verwendeten Lokalanästhetika dem Amid-Typ angehören, soll diese Gruppe hier näher betrachtet werden.

Lokalanästhetika vom Amid-Typ sind sekundäre oder tertiäre Amine (siehe dazu Abbildung 2.1) mit pKs-Werten von 7,7 - 9,0, die stabile wasserlösliche Salze bilden. Sie liegen bei einem pH-Wert von 7,4, wie er im Gewebe vorliegt, überwiegend in der ionisierten Form vor. Für die Anflutung am Wirkort spielt die unprotonierte Form eine große Rolle, denn nur in dieser Form ist das Lokalanästhetikum membrangängig und kann in die Zelle aufgenommen werden. Daher ist der pH-Wert des Milieus für das Erreichen des intrazellulären Wirkorts entscheidend.

Am Wirkort kommt es dann an der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (auf der Innenseite der Membran), durch Bindung der protonierten Form der Lokalanästhetika (Abbildung 2.2), zu einer Verlängerung der Erholungszeit (Übergang vom inaktivierten in den geschlossenen Zustand) um den Faktor 10-1000, was zur Verlängerung der Refraktärperiode und einer Verringerung der Anzahl weitergeleiteter Impulse führt. Besonders betroffen davon sind hochfrequente (z.B. sensorische) Nerven.



Abbildung 2.2 Das Gleichgewicht der Lokalanästhetika A) Wirkform (Ammoniumion, protonierte Form); B) Transportform (tertiäres Amin, freie Base)

Des Weiteren spielt die Strecke eine Rolle, die das Lokalanästhetikum überwinden muss, d.h. der Durchmesser der Nervenfasern ist entscheidend. Deshalb fallen zuerst Fasertypen mit kleinem Durchmesser (B-, C- und  $\text{A}\delta$ -Fasern), die unter anderem für die Schmerzleitung verantwortlich sind, aus.

Dass das Hauptziel der pharmakologischen Wirkung der Lokalanästhetika durch die Beeinflussung von spannungsgesteuerten  $\text{Na}^+$ -Kanälen zu Stande kommt, ist durch eine große Anzahl von Studien bewiesen [16].

Bei der Auswahl des zu verwendenden Lokalanästhetikums ist aber auch dessen individuelles Wirk- und Nebenwirkungsspektrum zu beachten. Neben ihrer Hauptwirkung, der Schmerzausschaltung in der Peripherie, weisen die Lokalanästhetika nämlich bestimmte Nebenwirkungen auf. Diese Nebenwirkungen sind zwar größtenteils konzentrationsabhängig, können aber nie vollkommen vermieden werden [18].

---

### 2.1.1.1 Lidocain

Lidocain ist ein Lokalanästhetikum vom Amid-Typ (siehe Abbildung 2.3), das sich durch eine verhältnismäßig hohe Hydrolysestabilität auszeichnet, z.B. führt acht-stündiges Kochen mit 30 %-iger Salzsäure zu keiner messbaren Hydrolyse. Daher können Lösungen von Lidocain-HCl über 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert werden.

Nach intravenöser Applikation wird es zunächst in gut durchbluteten Geweben (z.B. Herz, Leber, Niere, Gehirn) angereichert, später dann in schlechter durchblutetes Gewebe (z.B. Muskulatur) umverteilt. Die Plasmaeiweißbindung liegt bei etwa 50-70 %. Der First-pass-Effekt ist relativ hoch. So liegt bei oraler Gabe die Bioverfügbarkeit bei 49 % [19]. Der Wirkmechanismus entspricht dem der anderen Lokalanästhetika.

Als Lokalanästhetikum wird Lidocain zur Oberflächen-, Leitungs- und Infiltrationsanästhesie eingesetzt. Im Vergleich mit anderen Lokalanästhetika kann es als Substanz mittlerer Wirkungsstärke und -dauer mit raschem Wirkungseintritt klassifiziert werden. Um ein Abdiffundieren von Lidocain vom Wirkort zu verhindern, wird es, da Lidocain-HCl nicht selbst eine vasokonstriktive Wirkung entfaltet, mit Vasokonstriktoren, meist Adrenalin, kombiniert.

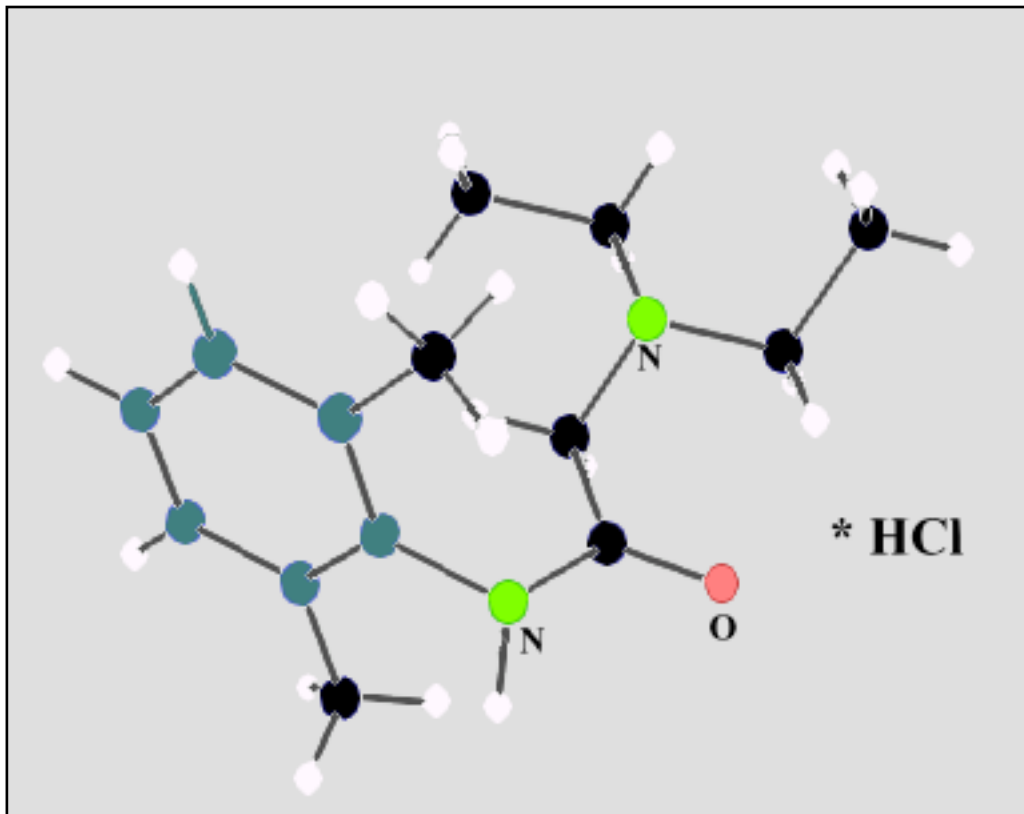


Abbildung 2.3 Struktur von Lidocain-HCl

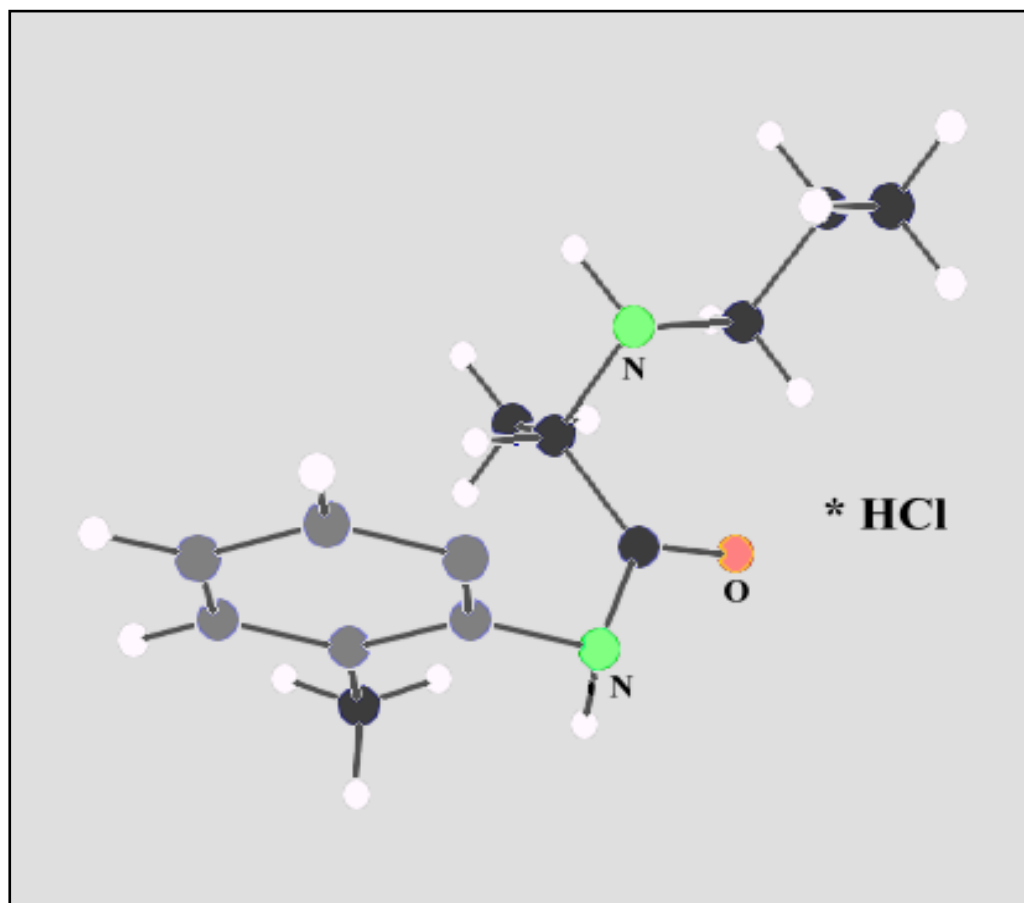


Abbildung 2.4 Struktur von Prilocain-HCl

---

### 2.1.1.2 Prilocain

Die Struktur des Prilocains als Hydrochlorid ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Der Wirkmechanismus des Prilocains ist analog dem des Lidocains [20]; ebenso das pharmakokinetische Verhalten [21]. Im Vergleich mit Lidocain führt Prilocain jedoch zu weniger neurologischen Nebenwirkungen [22].

Dieses könnte darin begründet liegen, dass Prilocain eine Kontraktion der glatten Muskeln der Arterien bewirkt und dadurch länger am Applikationsort bleibt, während Lidocain zu einer Relaxation der glatten Muskeln führt und so leichter in die Umgebung diffundiert [23]. In diesem Zusammenhang muss Prilocain im Gegensatz zu Lidocain auch nicht mit Vasokonstriktoren kombiniert werden. Durch Konstriktion der Arterien verbleibt das Lokalanästhetikum am Wirkort, sodass eine geringere Menge an Lokalanästhetikum nötig ist und sich eine Verringerung der Nebenwirkung ergibt.

Prilocain weist außerdem gegenüber Lidocain eine etwa 40 % geringere Toxizität auf. Die toxischen Symptome treten auf, wenn der Blutplasmaspiegel eine Grenzkonzentration überschreitet. Diese wird bei Prilocain nicht so leicht erreicht wie bei Lidocain, da Prilocain eine höhere renale Exkretion aufweist [24].

Gegenüber Lidocain hat Prilocain außerdem den Vorteil, dass es keine Porphyrie herbeiführen kann. Der routinemäßige Gebrauch von Prilocain statt Lidocain, um den durch die Propofol-injektion induzierten Schmerz zu lindern, würde das Risiko dieser Nebenwirkungen vermeiden [4].

Andererseits verursacht Prilocain im Gegensatz zu Lidocain, eine Methämoglobinbildung. Prilocain wirkt dabei nicht direkt als Methämoglobinbildner, sondern sein Metabolit 2-Toluidin. Gerade in Bezug auf die Metabolisierung unterscheiden sich die beiden Enantiomere des Prilocain insofern, als dass das R-Enantiomer schneller hydrolysiert wird als das S-Enantiomer [25]. Hinsichtlich der Wirksamkeit unterscheiden sich die beiden Enantiomere hingegen nicht.

Während die lokale Applikation über die Haut von Prilocain-Lidocain-Creme [26] auch für Babys sicher ist, ist eine peridurale Applikation abzulehnen, da es hier bei Kleinkindern aufgrund einer geringeren Aktivität der Methämoglobinreduktase [27] vermehrt zur Methämoglobinbildung kommt. Da die Methämoglobinreduktase erst ihre volle Aktivität entfalten muss, ist die Toleranz gegenüber Methämoglobin bei älteren Kindern und Erwachsenen höher [28]. Daher tritt bei Erwachsenen, auch bei einer höheren Dosierung, keine Methämoglobinämie auf [29].



### 2.1.2 Propofol

Propofol (2,6 Diisopropylphenol) (Abbildung 2.5) wird als Injektionsnarkotikum eingesetzt. Da es sehr schwer wasserlöslich ist, wird es in einer Fettemulsion verabreicht (log Octanol/Wasser Verteilungsquotient = 4,33).

Propofol wird unter Zuhilfenahme von Cytochrom P-450 zu 2,6-Diisopropyl-1,4-quinol (4-Hydroxypropofol) metabolisiert [30] (Abbildung 2.6). Eine unterschiedliche Aktivität des Cytochroms P-450 kann somit intra- und interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik erklären. Die normalerweise schnelle Metabolisierung des Propofols ist z.B. bei einer Entzündung verlangsamt und führt zur Erhöhung der Halbwertszeit [31].

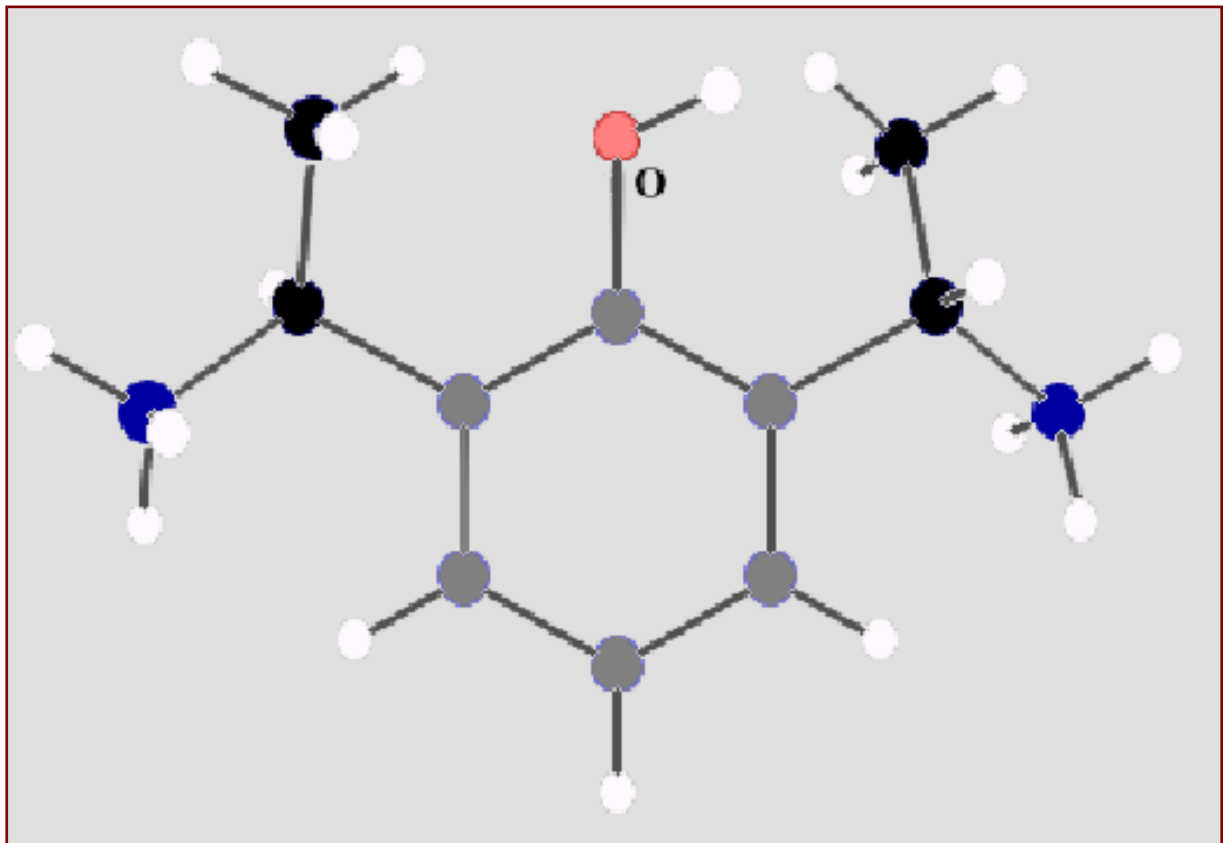


Abbildung 2.5 Struktur des Propofols

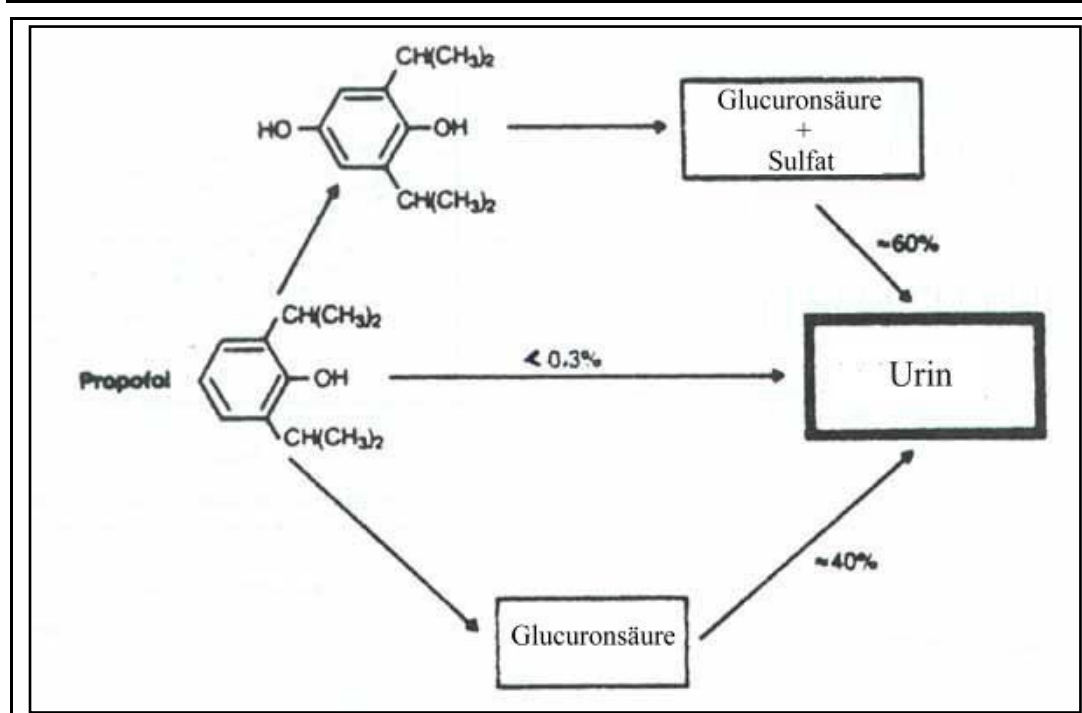


Abbildung 2.6 Propofol Metabolismus (nach MHA (MetroHealthAnesthesia))

Sowohl inhalativ als auch intravenös verabreichte Narkosemittel greifen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, einem Liganden-gesteuerten Cl<sup>-</sup>-Ionen Kanal, an, so auch Propofol [32]. Im Falle des Propofols sind die Alkylgruppen der Positionen 2 und 6 am aromatischen Ring für die Wirkung sehr wichtig [33, 34]. Yang et al. kamen in ihrer Untersuchung zu dem Ergebnis, dass es einen 'Schwellenwert' der Plasmakonzentration (1,7-1,8 µg/ml) für eine Narkose mit Propofol gibt. Ob dieser Schwellenwert durch eine Bolusinjektion oder durch kontinuierliche Gabe erreicht wird, ist ohne Einfluss auf die Narkose [35].

Im Vergleich mit anderen intravenös verabreichten Anästhetika bewirkt Propofol einen schnellen Wirkungseintritt, eine nur kurze postoperative Konfusion [36] und hat ein sehr positiv zu bewertendes Wirkungs-/Nebenwirkungsverhältnis. Propofol sollte daher eine bedeutende Rolle in der anästhetischen Praxis spielen [1].

Eine weitere positive Eigenschaft ist, dass Propofol antioxidierend wirkt. Es kann hierbei sogar das endogene Antioxidans, α-Tocopherol, ersetzen. Die Wirkung ist darauf zurückzuführen, dass Propofol wie α-Tocopherol eine phenolische Hydroxylgruppe aufweist (Abbildung 2.7) [37].

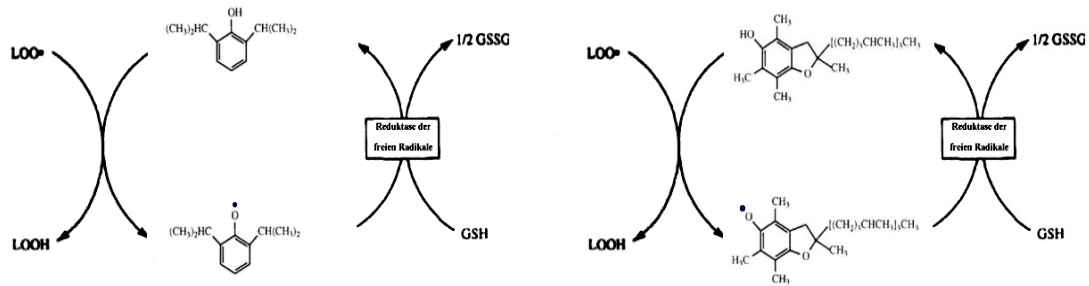


Abbildung 2.7 Die Wirkung als Antioxidans von Propofol (links) und  $\alpha$ -Tocopherol (rechts).

Es wird aus der phenolischen Verbindung das Radikal gebildet, welches dann in der Leber durch die mikrosomale GSH-abhängige Reduktase zurück in die phenolische Verbindung reduziert wird [nach 37].

GSH =  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycine, Glutathion (reduziert)

GSSG = Glutathion (oxidiert)

Die Konzentration an Propofol, die für den antioxidativen Effekt benötigt wird, liegt hierbei im selben Konzentrationsbereich, wie die für den anästhetischen Effekt benötigte. Daher ist dieser antioxidative Effekt auch im Zuge der Anästhesie zu erwarten, was besonders bei Krankheiten, die mit einem Gewebeschaden durch Sauerstoffradikale einhergehen (z.B. Ischämie und Entzündung), von Nutzen ist [38].

Für eine Anästhesie mit Hilfe einer Propofol-Emulsion spricht außerdem die in der Literatur viel beschriebene antiemetische Wirkung des Propofols [39]. Diese fehlt bei anderen üblicherweise verwendeten Narkotika, weshalb zu einer Anästhesie die intravenöse Anwendung einer Propofol-Emulsion vorzuziehen ist [40]. Die Vermeidung von Übelkeit und Erbrechen in der postoperativen Phase (PONV) ist deshalb so wichtig, weil sie nicht nur bei dem Patienten einen sehr hohen Stellenwert genießt, sondern auch zu einer deutlichen Reduktion der Folgekosten führt [41]. Obwohl der Mechanismus der antiemetischen Wirkung von Propofol zur Zeit noch unklar [40] ist, wird diese auch unabhängig von der anästhesierenden Wirkung (z.B. bei der Chemotherapie) genutzt [42]. Allerdings gibt es, neben zahlreichen Autoren, die die antiemetische Wirkung des Propofols in ihren Untersuchungen bestätigen konnten, andere Autoren, die eine signifikante Veränderung der PONV nach einer propofolgeführten Anästhesie nicht feststellen konnten [43].

---

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, ist die intravenöse Anästhesie mit Hilfe einer Propofolinjektion mit Schmerzen an der Einstichstelle verbunden. Um diese zu vermeiden, sind verschiedene Maßnahmen und mehrere Arzneistoffe getestet worden. Eine gute Übersicht der Vermeidung des Injektionsschmerzes bei einer Anästhesie mit Propofol, liefern Picard und Tramer [44] sowie Tan und Onsiong [45].

Der Wirkmechanismus, auf dem die schmerzhaftige Wirkung des Propofols beruht, ist bis heute ungeklärt [46].

Zur Schmerzvermeidung wurde die Variation einer Reihe von Maßnahmen, wie des Orts der Injektion, der Injektionsgeschwindigkeit, der Temperatur und Verdünnung der Propofol-Emulsion untersucht. Daneben wurde auch die Schmerzreduktion durch Arzneistoffe getestet. Hierbei zeigten sich besonders die Lokalanästhetika als erfolgreich.

Laut Eriksson et al. [7, 46] erfolgt die Reduktion der Propofol induzierten Schmerzen bei Addition von Lidocain-HCl hauptsächlich durch eine Herabsetzung des pH-Werts, wodurch die Propofolkonzentration in der wässrigen Phase vermindert wird. Während die Änderung des pH-Werts durch das Hydrochlorid einerseits zu einer Abnahme des Injektionsschmerzes bei der Applikation der Propofol-Emulsion führt, bewirkt das Lokalanästhetikum andererseits eine Abnahme der Stabilität der Propofol-Emulsion [46].

Die Reduktion des Injektionsschmerzens bei Abnahme der Propofolkonzentration in der wässrigen Phase wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [47].

Auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit des Propofolmoleküls muss dieses in Form einer O/W-Emulsion verabreicht werden. Die schmerzhaften Reaktionen bei einer Injektion von Propofol kommen durch Kontakt des Propofols mit den Wänden der Blutgefäße zu Stande. Eine Injektion in kleinere Venen führt also zu signifikant stärkeren Schmerzen [47] als eine Injektion in größere Venen. Deshalb ist der Propofolinjektionsschmerz bei Kindern aufgrund ihrer kleineren Venen höher [45].

Neben der erläuterten direkten Schmerzentwicklung, bewirkt Propofol auch eine verzögerte Schmerzentwicklung [45]. Es wird angenommen, dass diese über die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems zu Stande kommt [48]. In diesem Zusammenhang testeten Nakane und Iwama den synthetischen Serininhibitor Nafamostatmesilat, da dieser bei anderen Anwendungen ein inhibitorisches Potential hinsichtlich des Plasmakallikreins zeigte [49]. Es wurden bei der Verwendung von Nafamostatmesilat schmerzlindernde Wirkungen bei einer Propofolinjektion erreicht [50], die der, die durch einen Lidocainzusatzes erreicht wird, vergleichbar ist [49]. Im Vergleich mit Lidocain-HCl ist Nafamostatmesilat etwa 20 mal billiger [49].

Neben der Schmerzlinderung durch Arzneistoffgabe verfolgt man eine Schmerzvermeidung außerdem durch eine strukturelle Veränderung des Propofolmoleküls. Dadurch soll die Löslichkeit des Propofols in der wässrigen Phase erhöht werden und so der Übergang von der Emulsion zur Lösung möglich sein [51].

## 2.2 Phospholipide

Die molekulare Struktur des Phosphatidylcholins ist in Abbildung 2.8 ersichtlich.

Phosphatidylcholin mit seinem typischen Aufbau gehört wie andere Glycerophospholipide zur Gruppe der Lecithine und macht beim Eilecithin den Hauptanteil aus (Tabelle 2.1). Das Glycerin-Molekül ist in Form eines Esters mit zwei in der Regel verschiedenen Fettsäuren verbunden. Die dritte Hydroxylgruppe ist mit einer Phosphorsäure verestert.

Eine umfangreiche Darstellung über die Phosphoglycerolipide liefert D.M. Small [52].

Die Phosphoglycerolipide werden danach unterschieden, mit welchem Alkohol die Phosphorsäure verestert ist. Beim Eilecithin ist dieser Alkohol hauptsächlich Cholin. Auch das in dieser Arbeit eingesetzte Phospholipon® 90 G hat einen Anteil von mehr als 90 % an Phosphatidylcholin. (In der weiteren Arbeit wird Lecithin synonym für Phosphatidylcholin verwendet.)

Das Molekulargewicht schwankt mit der Fettsäurezusammensetzung zwischen 750 und 870 [53].

Nach der Rohstoffquelle teilt man Lecithin nach pflanzlicher oder tierischer Herkunft ein. Je nach Herkunft variiert auch das Inhaltsspektrum (Tabelle 2.1). Als Quelle für tierisches Lecithin kommt das Hühnerei in Frage, als Quelle für das pflanzliche Lecithin u.a. Sojabohnen, Raps und Sonnenblumen [54]. Obwohl die Verwendung von Sojalecithin in der Kosmetik und in der pharmazeutischen Industrie gebräuchlich ist, sind die meisten Arbeiten mit Lecithin, gewonnen aus Eigelb, durchgeführt worden [55]. Einen Überblick über die genauen analytischen Methoden zur Bestimmung der Zusammensetzung von Sojalecithin liefert Pardun [56].

	<b>A</b>	<b>B*</b>
Phosphatidylcholin	10-15	65-70
Phosphatidylethanolamin	9-12	9-13
Phosphatidylinosit	8-10	-
Phytoglykolipide	4-7	-
Phosphatidylserin	1-2	-
Phosphatidsäure	2-3	-
Lysophosphatidylcholin	1-2	2-4
Lysophosphatidylethanolamin	1-2	2-3
Phytosterine und -ester	0,5-2,0	-
P-haltige unbekannte Lipide	5-8	-
Sphingomyelin	-	2-3
Saccharose	2-3	-
Freie Fettsäuren	Max. 2	Max. 1
Mono- und Diglyceride	Max. 1	Spuren
Wasser	Max. 1,5	Max. 1,5
Triglyceride	Ca. 35-40	10-15

\* Im Eilecithin ist zusätzlich Cholesterin enthalten.

Tabelle 2.1 Zusammensetzung von A) flüssigem Sojalecithin (Standardtype mit 60-62 % in Aceton unlöslichem Anteil) und B) Eilecithin pastös (in %) nach [54]

Phospholipide werden seit über 50 Jahren sowohl in der Kosmetik, als auch in der Pharmazie verwendet. In der Kosmetik spielen sie vor allem in liposomaler Form eine große Rolle. Der wichtigste Effekt, der in der Kosmetik durch Liposomen erreicht werden soll, ist die Erhöhung der Hautfeuchte.

Diese kann schon mit Liposomen ohne verkapselten Wirkstoff erreicht werden [57, 58]. Daneben können aber in den Liposomen auch Hautpflegestoffe oder Arzneistoffe verkapselt werden [58, 59]. Eine Übersicht über liposomhaltige Kosmetika geben Raab und Kindl [58].

Auch in der Pharmazie spielen die Phospholipide eine sehr gewichtige Rolle. Neben den Effekten, die die Lecithine auf Grund der Ähnlichkeit zu Membranbestandteilen entfalten, wird viel Hoffnung auf Phospholipide in Form von Liposomen gesetzt (Kapitel 2.5).

Die Verwendung von Lecithin als Baustoff für Liposomen hat den Vorteil, dass dieses un-toxisch und bioabbaubar [60] ist. Der gefahrlose Gebrauch von Lecithin wurde von der Weltgesundheitsorganisation, der DGE und der FDA bestätigt. Auch in der europäischen Union unterliegt das Lecithin keinen Restriktionen hinsichtlich der Anwendung in der Lebensmittelchemie, wird sogar vereinzelt als Zusatznahrung empfohlen [61].

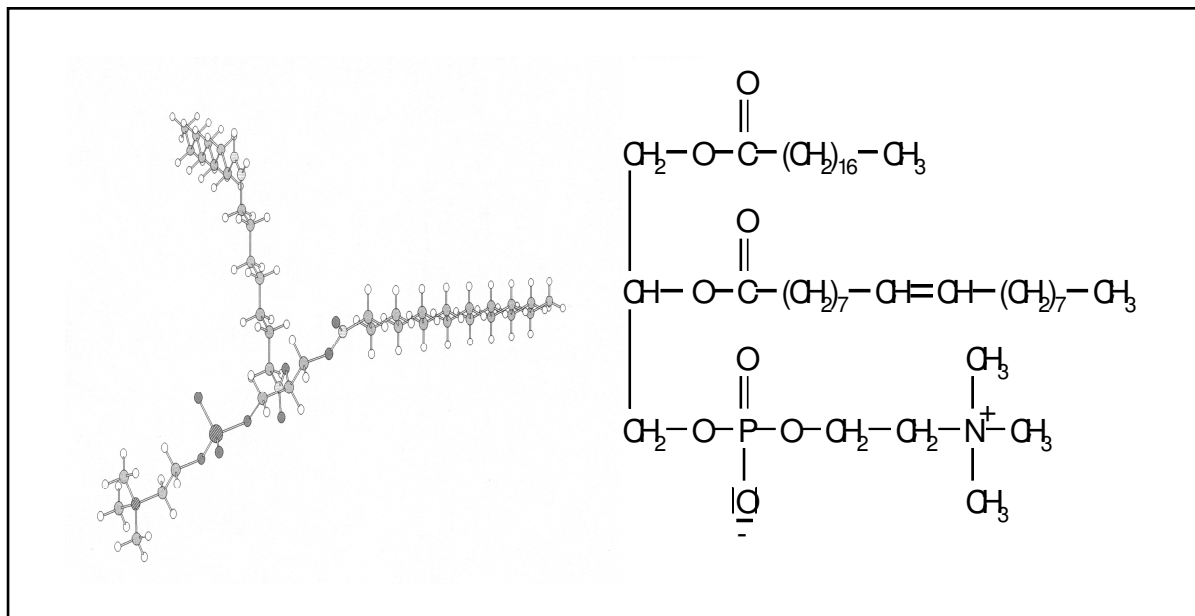


Abbildung 2.8 Struktur des Phosphatidylcholins

## 2.3 Amphiphile Moleküle

Amphiphile Moleküle besitzen einen hydrophilen und einen lipophilen Teil [62]. Der Prototyp für alle amphiphilen Moleküle ist eine gesättigte Fettsäure  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  (Abbildung 2.9) [63]. Eine pH-abhängige Dissoziation sowie eine temperaturabhängige Hydratation der polaren Carboxylgruppe verursachen eine variierende Amphiphilie.

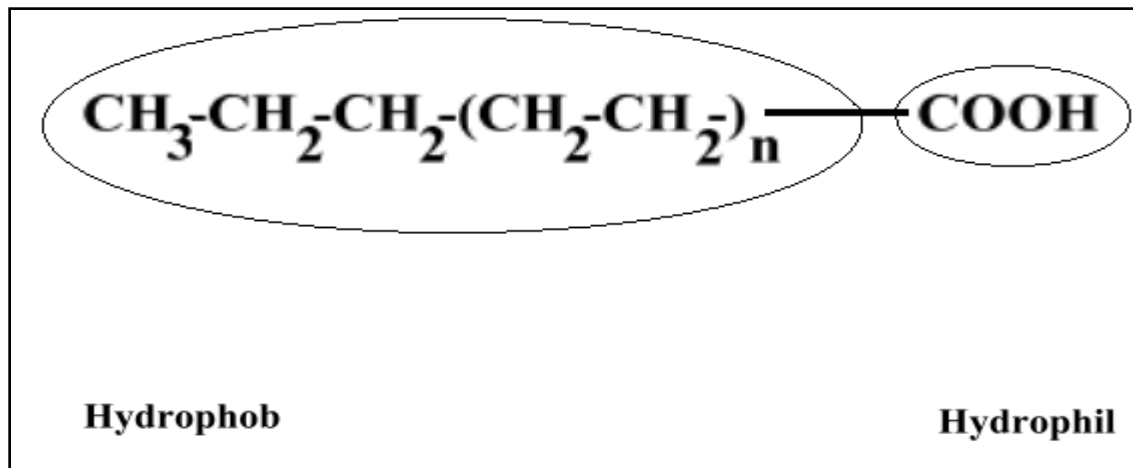


Abbildung 2.9 Amphiphilie am Beispiel einer Fettsäure

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich wässrige Systeme verwendet werden, soll hier nur das wässrige Milieu betrachtet werden. Amphiphile Moleküle können in wässrigem Medium Assoziate bilden, wodurch die Kontaktfläche des lipophilen Molekülteils mit dem wässrigen Milieu verringert wird.

Das Assoziationsverhalten amphiphiler Moleküle wird durch folgende Wechselwirkungen bestimmt:

4. elektrostatische Abstoßung im Bereich der polaren Kopfgruppen
5. Wasserstoffbrückenbindungen durch Hydratisierung der polaren Kopfgruppen
6. Entropiesteigerung im wässrigen Medium durch Zusammenlagerung und hydrophobe Bindungen im lipophilen Molekülteil der amphiphilen Moleküle
7. Dispersionskräfte durch Erzeugung eines schwachen, temporären Dipols im lipophilen Molekülteil



---

## 2.4 Assoziationskolloide in wässriger Lösung

Kolloidale Dimensionen werden im Allgemeinen von Oligo- oder Polymeren gebildet. Assoziationskolloide entstehen durch eine Zusammenlagerung zahlreicher Moleküle oder Molekülsegmente zu größeren Verbänden, den Assoziaten oder Mizellen, die kolloidale Dimensionen einnehmen. So bestehen die Kugelmizellen mit einem Durchmesser von 5-15 nm aus 50-200 Molekülen. Die Anzahl der Moleküle, die sich am Aufbau eines komplizierteren Strukturelements, wie z.B. der einzelnen Schicht der Lamellarphase, beteiligen, ist dagegen unverhältnismäßig größer.

Die thermodynamische Betrachtung (Gleichung 2.1) zeigt, dass die Assoziation vorwiegend entropiekontrolliert abläuft,

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S \quad \text{(Gleichung 2.1)}$$

wobei  $\Delta H$  die Bildungsenthalpie,  $T$  die Temperatur (in Kelvin) und  $\Delta S$  die Bildungsentropie ist. Eine Reaktion läuft nur dann spontan ab, wenn die freie Bildungsenergie  $\Delta G$  negativ ist.

Bei der Assoziation können Ordnungszustände auf Basis der wahrscheinlichsten Lage von Molekülen oder teilassoziierter Strukturen gebildet werden. Derartige Ordnungszustände werden als flüssigkristallin bezeichnet, weil sie in ihren Eigenschaften zwischen dem festen (kristallinen) und dem flüssigen Aggregatzustand stehen. Im Gegensatz zu der echt-kristallinen Struktur ist die Lage der einzelnen Atome nicht festgelegt und die Ordnungsbedingungen sind sehr einfach [64]. Die Moleküle besitzen unter dem Einfluss der thermischen Bewegung noch eine hohe Beweglichkeit und Austauschbarkeit, sodass diese Systeme in der Regel flüssig bis halbfest sind. Wegen des Zwischenzustands zwischen fester und flüssiger Phase wird die flüssigkristalline Phase auch als Mesophase bezeichnet.

Die flüssigkristallinen Assoziationskolloide können eingeteilt werden in thermotrope und lyotrope. Sie werden als thermotrop bezeichnet, wenn sie beim thermischen Übergang des echt-kristallinen Zustand in die Schmelze zwischenzeitlich entstehen, und als lyotrop, wenn sie sich konzentrationsabhängig aus amphiphilen Substanzen in Gegenwart eines Lösungsmittels bilden. Thermotrope Mesophasen sind also im einfachsten Fall Einkomponentensysteme, während lyotrope Flüssigkristalle immer aus mindestens zwei Komponenten, nämlich dem Mesogen und dem Dispersionsmittel, bestehen müssen.

---

Die thermotropen Assoziationskolloide werden nach dem Grad der Ordnung weiter eingeteilt in nematische, cholesterinische und smektische Mesophasen. Die lyotropen Flüssigkristalle gliedern sich in verschiedene Assoziate, z.B. kubische Phase, Hexagonalphase und Lamellarphase.

Einen Überblick über lyotrope Flüssigkristalle und ihre Bedeutung in der Pharmazie liefert Müller-Goymann [65].

Welche Assoziatform ausgebildet wird, hängt von Faktoren des Lösungsmediums (Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke [66]) sowie von der Konzentration und Geometrie des amphiphilen Moleküls ab.

Zur Vorhersage der resultierenden Assoziatform ist ein einfaches Modell entwickelt worden [67-69]. Hierbei wird durch den Packungsparameter P auf Grundlage der Molekülgeometrie auf die resultierende Assoziatform geschlossen.

Der Packungsparameter P ergibt sich aus Gleichung 2.2,

$$P = V/(A \cdot l) \quad \text{(Gleichung 2.2)}$$

wobei V das Volumen des lipophilen Molekülbereiches, A die Querschnittsfläche der polaren Kopfgruppe der Grenzfläche und l die Länge des Moleküls bedeuten. Somit ist der resultierende Packungsparameter P dimensionslos. Dem Packungsparameter kann dann die jeweilige Assoziatform (Abbildung 2.10) zugeordnet werden.

Nach ihrem Assoziationsverhalten in Wasser können die amphiphilen Substanzen in verschiedene Klassen eingeteilt werden.

- I. In Wasser praktisch unlösliche Amphiphile, wie z.B. Triglyceride, langkettige Fettsäuren oder Steroide, führen weder zur Mizellbildung noch zur Bildung von Flüssigkristallen
- II. In Wasser unlösliche aber quellbare Amphiphile, die in der Lage sind, lyotrope Flüssigkristalle zu bilden, wie z.B. Phospholipide

- IIIa. In Wasser lösliche Amphiphile, die in der Lage sind, sowohl Mizellen als auch lyotrope Flüssigkristalle zu bilden, wie z.B. die meisten kationischen und anionischen Detergenzien und das Lysolecithin
- IIIb. In Wasser lösliche Amphiphile, die ausschließlich zu Mizellen assoziieren können, wie z.B. Gallensalze

Nur Amphiphile der Klasse II, zu denen auch die Phospholipide gehören, mit einem Packungsparameter von etwa 1, sind in der Lage, Liposomen zu bilden [70].

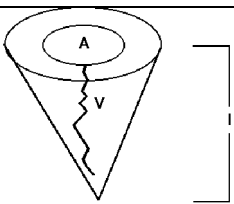
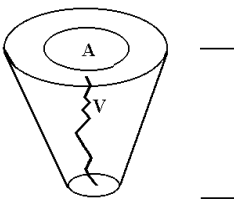
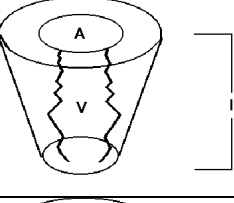
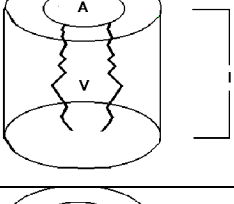
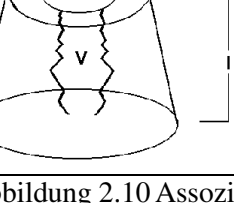
Geometrisches Modell	Packungsparameter	amphiphiler Stoff	Assoziatform
	$< 0,33$	Tenside mit einer großen polaren Kopfgruppe und <b>einer</b> lipophilen Kette	kugelförmige oder ellipsoide Mizellen; Kubische Mesophasen
	$0,33 - 0,5$	Tenside mit einer kleinen polaren (bzw. ionischen in Gegenwart von Elektrolyten) Kopfgruppe und <b>einer</b> lipophilen Kette	stäbchenförmige Mizellen hexagonale Mesophase
	$0,5 - 1,0$	Tenside mit einer kleinen polaren Kopfgruppe und <b>zwei</b> flexiblen, lipophilen Ketten	Vesikel und flexible Bilayer
	$1,0$	Tenside mit einer kleinen polaren Kopfgruppe und <b>zwei</b> starren Ketten	plane, ausgedehnte Bilayer; lamellare Mesophase
	$> 1,0$	Tenside mit einer kleinen polaren Kopfgruppe und <b>zwei</b> voluminösen, lipophilen Ketten	inverse Mizellen; inverse hexagonale Mesophase

Abbildung 2.10 Assoziatform bei einem bestimmten Packungsparameter

---

## 2.5 Liposomen

Liposomen sind kugelförmige, gegebenenfalls aus mehreren Moleküldoppelschichten bestehende Partikel. Sie werden von amphiphilen Molekülen gebildet.

Neben den häufig verwendeten Phospholipiden, können auch andere amphiphile Moleküle als Ausgangsmaterial verwendet werden.

Daneben werden häufig Steroide und ladunginduzierende Substanzen zugesetzt. Die Fähigkeit von Phospholipiden, Liposomen zu bilden, wurde per Zufall zum ersten Mal 1961 von Bangham [71] beobachtet, als er den Einfluss von Phospholipiden auf die Blutgerinnung untersuchte. Den Namen Liposomen erhielten sie dann von Sessa und Weissman 1968 [72].

Je nach Polarität löst sich ein Arzneistoff im hydrophilen Kern oder im Bereich der lipophilen Membrandoppelschicht (siehe Abbildung 2.12). Die Beladung der Liposomen erfolgt bei hydrophilen Arzneistoffen direkt bei der Dispersion der Lipide in Wasser, bei hydrophoben Arzneistoffen durch Lösen in der Schmelze der Fettkomponente (siehe Kapitel 2.5.5).

Liposomen sind durch folgende physikalisch-chemische Parameter charakterisiert [73]:

- Zahl der Membrandoppelschichten (Lamellarität)
- Mittlerer Teilchendurchmesser der Vesikel
- Homogenität der Liposompopulation (Vorhandensein nicht-liposomaler Teilchen)
- Oberflächenladungsdichte
- Membranfluidität (gel- oder fluid-state)

(siehe Kapitel 2.5.4).

Mit Liposomen können pharmakologisch wirksame Substanzen umhüllt werden. Auf diese Weise wird dann die Pharmakokinetik und gegebenenfalls auch die Pharmakodynamik der Substanzen verändert, was bisher nur durch chemische Veränderungen zu erreichen war [74-76]. Durch die Verkapselung in Liposomen werden Arzneistoffe gegen Abbauprozesse, z.B. Hydrolyse, geschützt [77]. Neben diesen positiven Effekten für den inkorporierten Arzneistoff, setzte man auch große Hoffnung darauf, den Wirkstoff zielorientiert an den Wirkort zu bringen. Letzteres wird als sogenanntes "Drug Targeting" bezeichnet. Auf diese Weise soll der Arzneistoff effektiver wirken, und die unerwünschten Arzneimittelwirkungen sollen reduziert werden. In diesem Zusammenhang wurden Liposomen zur Verabreichung verschiedener Arzneistoffe wie Antibiotika [78-80], Zytostatika [81], Antimykotika [82], Antimalariamittel, Antioxidantien [83], wasserlösliche Kontrastmittel [84], Makromoleküle (z.B. Peptide, Proteine, Enzyme) [85] bzw. als Vektoren für z.B. Nukleinsäuren [86] ver-

---

wendet. Die Applikation der liposomalen Dispersionen kann ebenfalls auf den verschiedensten Wegen erfolgen, je nachdem, welche Zielzelle erreicht werden soll; neben der intravenösen und peroralen Applikation wurden auch andere Applikationswege, wie der intranasale [87], intrathekale [88], pulmonale [89], ophthalmische [90], vaginale [91], topische [92], subcutane [93] beschrieben.

Das Targeting kann weiter verfeinert werden, indem sogenannte Immunoliposomen eingesetzt werden. Sie tragen an ihrer Oberfläche Antikörper, die an spezifische Oberflächenstrukturen der Zielzellen binden [94].

Es muss aktives und passives Targeting unterschieden werden [57, 94, 95]. Wenn die Zielzellen Bestandteile des natürlichen Abwehrsystems sind, wie Makrophagen oder Leberzellen, werden diese passiv erreicht, d.h. die Liposomen werden mit dem Blutstrom transportiert. Dieses wird dann als passives Targeting bezeichnet. Anders beim aktiven Targeting. Hier soll das Ziel aktiv angesteuert werden, was im Falle von Immunoliposomen erfolgreich erreichbar ist.

Neben dem Drug Targeting werden Liposomen noch für weitere Zwecke eingesetzt.

Auf Basis der Ähnlichkeit der Liposomen mit den roten Blutkörperchen wurde im Tierversuch bestätigt, dass Hämoglobin in Liposomen inkorporiert wird und so der Sauerstofftransport sichergestellt werden kann [96].

Nicht zuletzt wird den Liposomen ein adjuvanter Effekt bei der Immunantwort auf Impfstoffe zugeschrieben [97, 98].

### 2.5.1 Entstehung und Systematik von Liposomen

Die vorherrschende Lehrmeinung geht heute davon aus, dass die Hydratisierung einer ausreichenden Menge an Phospholipiden zu einer entropiegesteuerten, spontanen Formation von Liposomen führt [70, 99] (siehe Abbildung 2.11). Die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten sind hierbei in das Innere der Vesikel gerichtet, während die hydrophilen Phosphat-Kopfgruppen die Grenzfläche zum hydrophilen Medium bilden. Man nimmt an, dass jede Phosphat-Kopfgruppe von etwa 15 schwach gebundenen Wassermolekülen umgeben ist. Hierin kommt ihre klare Präferenz zum wässrigen Medium zum Ausdruck [14]. Die Zusammenlagerung der Fettsäureketten ist entropisch günstiger, da so die Störungen der Clusterstruktur des Wassers minimiert werden [14].

Auf Grund des Packungsparameters (Abschnitt 2.3) bilden die Phospholipide Assoziate in Form der Liposomen.

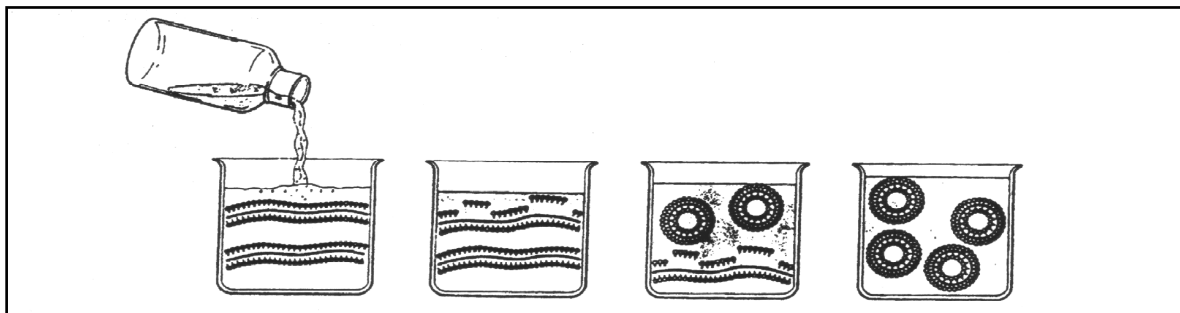


Abbildung 2.11 Aggregation der Phospholipide zu Liposomen durch Hydratation nach [99]

Die Bildung von Liposomen ist nur bei einer Temperatur möglich, die oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lecithins liegt ( $T > T_C$ , wobei  $T_C$  die Phasenübergangstemperatur ist). Der Phasenübergang findet hierbei zwischen der festen Form und der flüssig-kristallinen Phase statt. Es ist in zahlreichen Studien bestätigt worden, dass die Übergangstemperatur stark von der Länge der lipophilen Ketten, dem Grad ihrer Ungesättigtheit und der Chemie der polaren Kopfgruppe abhängt. So rufen gesättigte Fettsäuren mit Kettenlängen von 12 bis 18 Kohlenstoffatomen eine Erhöhung der Phasenübergangstemperatur hervor, während kürzere Fettsäuren diese erniedrigen [100]. Für Liposomen aus einem weitgehend homogenen Phospholipid kann man die Phasenübergangstemperatur exakt ermitteln. So liegt die Phasenübergangstemperatur für reines Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bei  $T = 41,85^\circ \text{C}$  [101].

Da aber aus natürlichen Quellen gewonnenes Lecithin verschiedene Fettsäuren in veresterter Form enthält, sind sehr breite Signale bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) zu erwarten [102]. Man erhält keine punktuelle Übergangstemperatur, sondern einen Temperaturbereich.

Des Weiteren beeinflussen auch die inkorporierten Arzneistoffe die Übergangstemperatur. So bewirken kationische amphiphile Arzneistoffe z.B. Lokalanästhetika, tricyclische Antidepressiva, Phenothiazin-Neuroleptika und Anthracycline eine Erniedrigung der Übergangstemperatur [103].

Außerdem wird die Phasenübergangstemperatur durch den pH-Wert und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Salzgehalt des Mediums beeinflusst [104]. Ferner spielen Polypeptid- oder Proteininteraktionen, Interaktionen mit Metallionen und die Wasserkonzentration eine Rolle. Folgende Veränderungen im Zusammenhang mit einer veränderten Phasenübergangstemperatur sind möglich:

- Eine Zunahme des Abstandes zwischen benachbarten Molekülen und eine Abnahme der Lamellendicke
- Eine Zunahme der Rotationsisomerie von  $\text{CH}_2$ -Gruppen, bezogen auf die C-C Bindung
- Eine Zunahme der Beweglichkeit von  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$  Gruppen
- Eine Zunahme der Diffusionsrate der Lipide oberhalb der Übergangstemperatur
- Änderung der Interaktionen mit dem gebundenen Wasser bei der Übergangstemperatur [104]

In der Literatur wird allerdings kontrovers diskutiert, ob eine Formation von Liposomen durch bloße Hydratation aus Entropiegründen überhaupt möglich ist [105].

Die Liposomen werden nach der New York Academy of Sciences nach ihrer Größe und der Anzahl ihrer Lamellen unterteilt.

- a) mit mehreren Lipiddoppelschichten
  - oligolamellar large vesicles (OLV)
  - multilamellar large vesicles (MLV)
- b) mit einer Lipiddoppelschicht
  - small unilamellar vesicles (SUV)
  - large unilamellar vesicles (LUV)

---

### 2.5.2 Vesikel mit mehreren Lamellen

Oligo- bzw. multilamellare Vesikel bestehen im Unterschied zu unilamellaren Liposomen nicht aus einer Doppelschicht sondern aus mehreren bis zahlreichen Doppelschichten (Abbildung 2.12). Oligo- bzw. multilamellare Vesikel entstehen bei der direkten Hydratation eines trockenen Lipidfilms [75, 99]. Dieses geschieht auch bei der Dispergierung von Phospholipon® 90 G in Wasser.

Oligo- bzw. multilamellare Vesikel sind oft eine Zwischenstufe bei der Herstellung unilamellarer Vesikel. Sie bestehen aus konzentrischen Lipiddoppelschichten, die durch eine Flüssigkeit z.B. Wasser voneinander getrennt sein können.

Ein sich im hydrophilen Bereich der Liposomen befindlicher Arzneistoff wird retardiert freigesetzt.

Die Größe multilamellarer Vesikel liegt bei 500 nm – 10 µm. Die Gewinnung des trockenen Lipidfilms und die anschließende Hydratisierung erfolgt meist nach der Filmbildungsmethode. Hierbei wird das Lipid erst in einem lipophilen Medium z.B. Tetrahydrofuran gelöst und dann das Lösungsmittel am Rotavapor entzogen. Der zurückbleibende Lipidfilm wird durch Zugabe eines wässrigen Mediums hydratisiert [71].

Von der verwendeten Methode und vom Zeitraum, in dem die Hydratation erfolgt, hängen die meisten Eigenschaften der Vesikel ab [57, 70, 106]. Leider ist die Bildung von MLVs mit einer großen Heterogenität, die Größe betreffend, verbunden [70].

Eine Untergruppe der MLVs bilden die stabilen plurilamellaren Vesikel (SPLV = Stable plurilamellar vesicles). Eine SPLV-Dispersion wird erhalten, wenn eine MLV-Dispersion einer Beschallung in einem Ultraschallbad ausgesetzt wird [107]. Verglichen mit den MLV weisen sie eine Anzahl von Doppelschichten auf, zeigen aber eine höhere Einschlusseffizienz und einen geringeren Verlust des Inhalts [107].



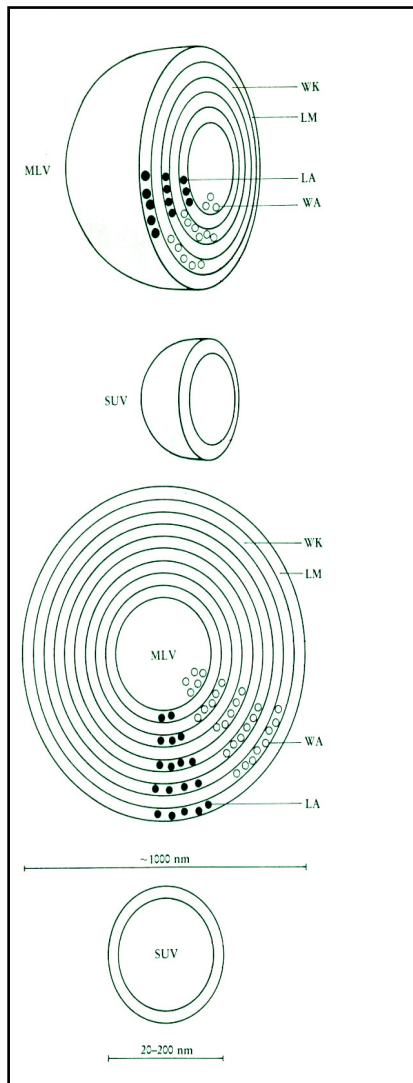


Abbildung 2.12 Querschnitt durch ein multilamellares (MLV) und ein unilamellares (SUV) Liposom. Wasserlösliche Arzneistoffe (WA) sind im wässrigen Kompartiment (WK), lipidlösliche Arzneistoffe (LA) in der Lipidmembran (LM) eingeschlossen (nach [75])

### 2.5.3 Vesikel mit einer Lamelle

Im Unterschied zu oligo- und multilamellaren Vesikeln ist bei unilamellaren Vesikeln der hydrophile, mit Flüssigkeit gefüllte Raum von nur einer einzigen Lipiddoppelschicht umgeben. Einen Vergleich der Struktur von uni- und multilamellaren Liposomen zeigt Abbildung 2.12.

Nach der Größe werden unilamellare Vesikel weiter eingeteilt in kleine (SUV) und große Vesikel (LUV).

---

### 2.5.3.1 Herstellung unilamellarer kleiner Vesikel (SUV)

Die Größe dieser Liposomen kann, je nach Herstellungsverfahren und Ausgangsmaterial, variieren und beträgt maximal 100 nm [70, 108].

Da nur eine Lipiddoppelschicht um den hydrophilen Kern vorliegt, resultiert daraus eine sehr starke Wandspannung. Eine spontane Bildung ist daher aus energetischer Sicht sehr unwahrscheinlich, sodass man zur Erzeugung der unilamellaren Vesikel auf bestimmte Herstellungsmethoden zurückgreifen muss.

Hierzu werden folgende Verfahren angewendet [57, 70]:

- Ultraschallung
- Injektionsmethoden
  - a) Injektion mit wasserunlöslichen Lösemitteln
    - Etherinjektionsmethode
    - Fluorocarboninjektionsmethode
  - b) Injektion mit wasserlöslichen Lösemitteln
    - Ethanolinjektionsmethode
- pH-Einstellung
- Pressen durch Polycarbonatfilter
  - Hochdruckhomogenisation
  - French Press
- Mischmizellbildung mit Gallensalzen und deren anschließender Abtrennung durch Dialyse

Am häufigsten wird bis heute die Methode der Verkleinerung der Liposomen mit Hilfe von Ultraschall eingesetzt, da dieses Verfahren neben seiner kurzen Zeitdauer durch eine sehr geringe Fehleranfälligkeit ausgezeichnet ist. Durch den sehr hohen Energieeintrag, der erwartungsgemäß einen entscheidenden Einfluss auf die Liposombildung und die Partikelgröße ausübt [109], ist es möglich, Liposomen mit einer Größe von 20 nm - 30 nm herzustellen. Hierbei ist die Umwandlung von multilamellaren in unilamellare Liposomen (Abbildung 2.13) nach den Beobachtungen von Dörfler et al. [109] nach 20 min abgeschlossen.

Dieses Herstellungsverfahren hat jedoch zwei große Nachteile. Einerseits steigt durch den hohen Energieeintrag bei der Behandlung mit Ultraschall die Oxidationsgefahr stark an [75], andererseits kann es durch den direkten Kontakt des Ultraschallgebers mit der Dispersion zu einer Kontamination der Zubereitung durch Metallabrieb kommen.

Normalerweise schließt sich an die Produktion kleiner Vesikel noch ein Reinigungsschritt an, da man neben den kleinen meist größere Vesikel vorliegen hat [70, 75]. Die Ultrafiltration ist allerdings bei Verwendung der üblicherweise verwendeten Celluloseacetat bzw. -nitratfilter mit folgenden Problemen behaftet:

- Ein merklicher Anteil an kleinen Vesikeln wird zusammen mit den abzutrennenden großen Vesikeln am Filter adsorbiert.
- Die meisten der käuflich zu erwerbenden Filter sind mit Chemikalien, meist Detergenzien, kontaminiert.
- Bedingt durch die Verdrängung können Filter unter bestimmten Bedingungen zu einer Veränderung der Vesikelcharakteristika (z.B. der Größe) führen.

Polycarbonatfilter weisen diese negativen Eigenschaften nicht auf [70].

Die hohe Membranspannung der Lipiddoppelschicht, bedingt durch die hohe Krümmung, führt zu einer gesteigerten Fusionsneigung. Da diese Krümmung der Membran mit abnehmender Größe der Liposomen zunimmt, neigen besonders SUVs zur Fusion. Als treibende Kraft der Fusion wird die hydrophobe Interaktion beschrieben [110].

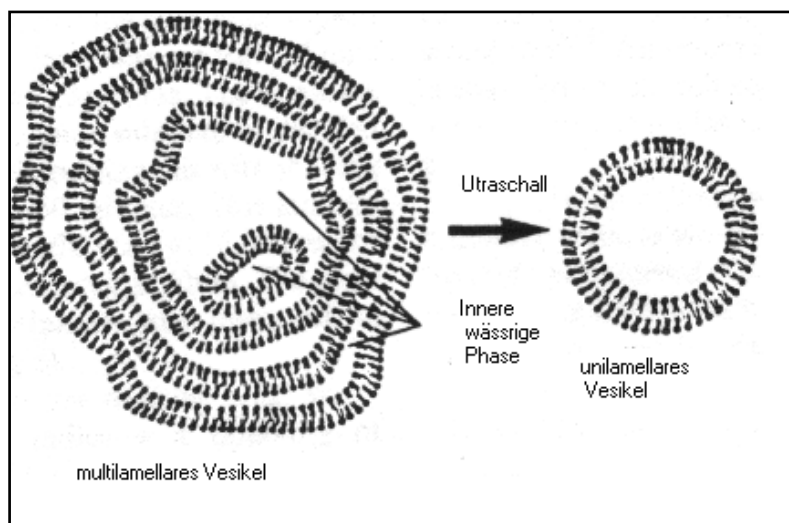


Abbildung 2.13 Die Umwandlung eines multilamellaren Vesikels in ein unilamellares Vesikel durch Ultraschall (nach [111])

---

### 2.5.3.2 Unilamellare große Vesikel (LUV) und ihre Herstellung

Die Größe dieser Liposomen beträgt mehr als 100 nm – 500 nm [14, 64]. Durch diese Größe sind sie praktisch frei von Membranspannung. Wie bei den SUVs ist die Vesikelgröße von der verwendeten Methode abhängig. Man erhält z.B. bei der Verwendung der Reverse-Phase-Evaporation Liposomen mit einem Durchmesser von bis zu 1000 nm (= 1 µm), wohingegen Liposomen, die unter Verwendung der optimierten Ethanolinjektionsmethode bzw. der variierten Methoden der Detergenzienabtrennung hergestellt werden, einen Durchmesser von 180 nm aufweisen [75].

Auch die großen unilamellaren Vesikel können mit mehreren Verfahren hergestellt werden [14, 57, 75]:

- Optimierung der Ethanolinjektion
- Variationen in der Mischmizellbildung (Weiterentwicklung des Prinzips der Detergensabtrennung aus gemischten Detergens/Lipid-Mizellen)
  - a) Verschieben des Verhältnisses Lipid zu Detergens
  - b) Dialyse durch sehr dünne Fiber-Schläuche
  - c) Dialyse durch Triple-Durchflusssdialyse-Zelle
- Säulenchromatographie
- Zentrifugation
- Reversephase-evaporation
- Gefrier-Tau-Verfahren

LUVs werden in erster Linie als Modelle für biologische Membranen verwendet [112].

---

## 2.5.4 Qualitätssicherung bzw. Qualitätskontrolle der Liposomen

Um als Arzneistoffträger genutzt werden zu können, muss die Qualität der Liposomen sichergestellt sein.

Liposomale Dispersionen werden vorwiegend hinsichtlich der folgenden drei Parameter charakterisiert: Vesikelgröße, Lamellarität und Einschlussvolumen [112].

Um die Vesikelgröße zu ermitteln, werden verschiedene Methoden verwendet [57]; neben Licht- und Elektronenmikroskopie, Coulter Counter, Sedimentationsfeldflussfraktionierung, Gelfiltration, Gelausschlusschromatographie (einschließlich HPSEC (**H**igh-**P**erformance **G**el **E**xclusion **C**hromatography)) kommt auch die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) zum Einsatz. Auch die Breite der Größenverteilung ist für einige Autoren ein wichtiger Parameter [57].

Zur Partikelgrößenbestimmung wurde in der vorliegenden Arbeit der Zetasizer III der Firma Malvern eingesetzt. Dieser bestimmt die Liposomengröße über den z-average sowie die Verteilung über den Polydispersitätsindex. Der z-average stellt einen intensitätsgewichteten  $D_{50}$ -Wert dar ( $D_{50}$ -Wert ist die Partikelgröße, die die Partikelgrößenverteilung in zwei gleichgroße Teile trennt, d.h. 50 % der Partikel sind  $\geq D_{50}$ -Wert bzw. 50 % der Partikel sind  $\leq D_{50}$ -Wert). Insofern begeht man einen Fehler, wenn man den z-average und nicht den wahren Mittelwert berücksichtigt. Trotzdem kann der vom Gerät direkt ausgegebene z-average verwendet werden, wenn nur Vergleiche angestellt werden sollen (Tabelle 2.2).

Vor der Messung am Zetasizer III muss die Probe verdünnt werden. Um eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung aufgrund der Vorverdünnung durch Volumeneffekte auszuschließen, müssen verschiedene Volumina derselben Probe vermessen werden.

Wenn eine Verdünnung der Probe in einem weiten Bereich keinen Einfluss auf die Verteilung hatte (Siehe Ergebnisse von Voruntersuchungen (Abbildung 2.14)), ist die Probenmenge jeweils so zu wählen, dass die Konzentration an Partikeln in dem für den Zetasizer III optimalen Bereich (bei ca. 200.000 counts) liegt (Kapitel 3).

Darüber hinaus ist ein eventueller Temperatureinfluss zu beachten. Durchgeführte Voruntersuchungen zur Temperierung für 10 min in einem Wasserbad im Bereich von 25 – 75 °C zeigten allerdings keine Auswirkungen auf den z-average oder die Polydispersität (Abbildung 2.15).

Lecithinkonzentration [%]	LS 13 320 (D <sub>50</sub> ) [nm]	z-average [nm]
4	83,86	175,67 ± 3,26
6	87,6	190,5 ± 1,15
8	83,67	182,33 ± 17,37
10	82,97	153,63 ± 1,21
12	84,1	167,43 ± 2,18
14	85,4	174,83 ± 10,37

Tabelle 2.2 Vergleich des D<sub>50</sub>-Wertes (LS 13320) und des z-averages (Zetasizer III) bei Partikelgrößenbestimmungen (n=3).

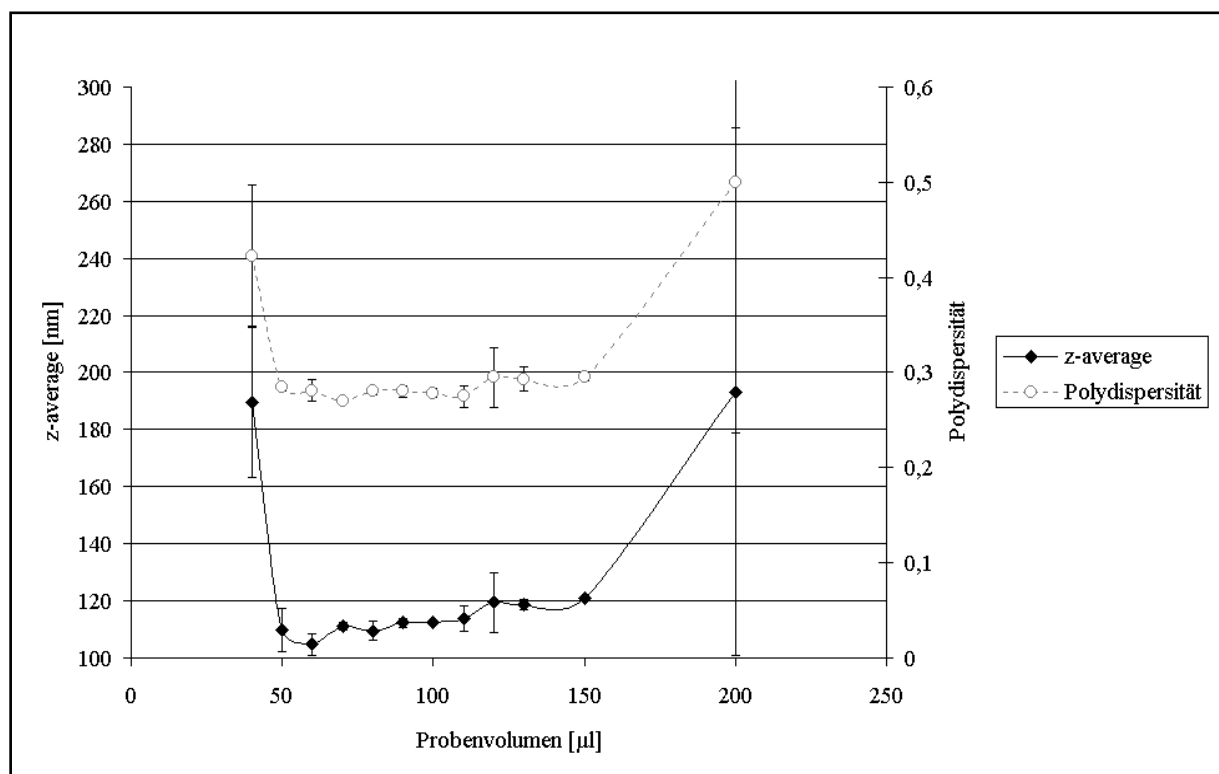


Abbildung 2.14 Polydispersität und z-average, abhängig von der Menge an Probenvolumen, das jeweils auf 3 ml Messvolumen verdünnt wurde (n=3).

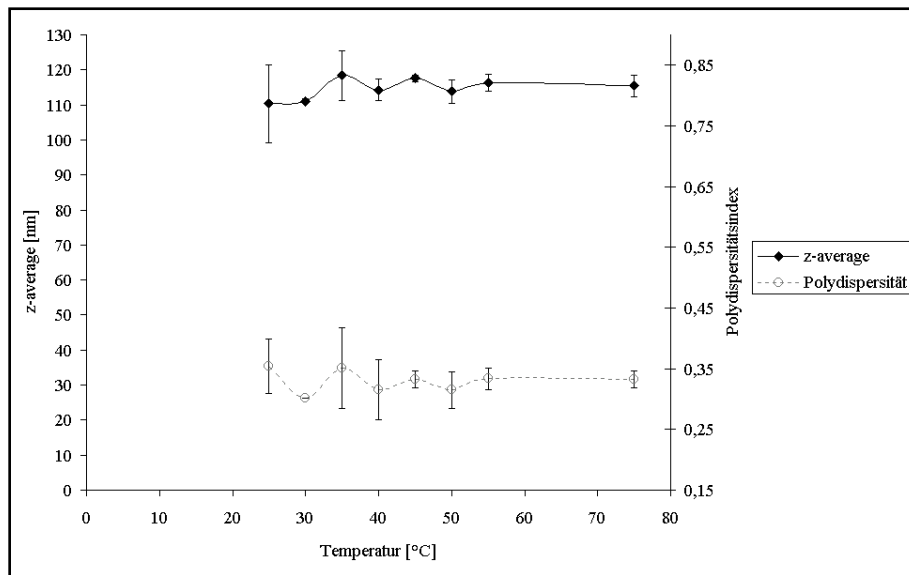


Abbildung 2.15 Polydispersitätsindex und z-average in Abhängigkeit von der Temperatur (n=3)

Bei unbekannten Proben kann die mittlere Partikelgröße nur abgeschätzt werden. Bei diesen wird der sogenannte estimate size, der erwartete mittlere Durchmesser, vor der Messung angegeben (Tabelle 2.3).

Bei den Voruntersuchungen stellte sich heraus, dass sogar eine deutliche Abweichung des abgeschätzten estimate size von den gemessenen Partikelgrößen nur geringe Auswirkungen auf den z-average hatte, während die Auswirkungen auf die Polydispersität größer waren (Tabelle 2.3).

Estimate size [nm]	z-average [nm]	Polydispersität
800	367,67 ± 23,28	0,222 ± 0,011
700	314,75 ± 40,80	0,265 ± 0,013
600	322,95 ± 6,15	0,262 ± 0,003
500	330,70 ± 15,13	0,275 ± 0,013
400	308,75 ± 3,89	0,292 ± 0,008
300	312,05 ± 2,76	0,333 ± 0,011
200	291,05 ± 5,16	0,359 ± 0,024
150	282,65 ± 4,45	0,396 ± 0,034
100	266,40 ± 4,95	0,420 ± 0,018
75	270,50 ± 4,53	0,463 ± 0,037
50	271,90 ± 7,35	0,554 ± 0,015
25	264,65 ± 0,21	0,716 ± 0,008
10	265,10 ± 4,95	0,502 ± 0,180

Tabelle 2.3 Polydispersität und z-average, abhängig vom geschätzten Mittelwert (estimate size) (n=3)

Zur Bestimmung der Anzahl der Lamellen können ebenfalls mehrere Methoden genutzt werden [57], u.a. auch die in dieser Arbeit verwendete diffuse Röntgenkleinwinkelstreuung,

Als dritter Parameter ist das Einschlussvolumen zu bestimmen. Das umschlossene Volumen wird häufig dadurch bestimmt, dass in das Innere der Liposomen „normale“ Ionen (z.B.  $\text{Li}^+$  [106]), radioaktive Ionen bzw. radioaktiv markierte Moleküle [95, 104, 109] oder Fluoreszenzfarbstoffe [113] eingebracht werden. Ihr Austritt aus den Liposomen in das umgebende Medium wird dann vermessen.

Es ist immer zu beachten, dass das Einschlussvolumen sehr vom Durchmesser der Liposomen abhängt (Abbildung 2.16). So umschließt ein Liposom von 200 nm Durchmesser ein mehr als doppelt so großes Volumen wie ein 100 nm großes Liposom und sogar ein mehr als 5fach größeres Volumen als ein Liposom mit dem Durchmesser von 50 nm [57].

Das innere Volumen und die Einschlusseffektivität hängen ab von:

- der Konzentration an Liposomen
- der Phospholipidmenge
- der Herstellungsmethode
- dem verwendeten Arzneistoff

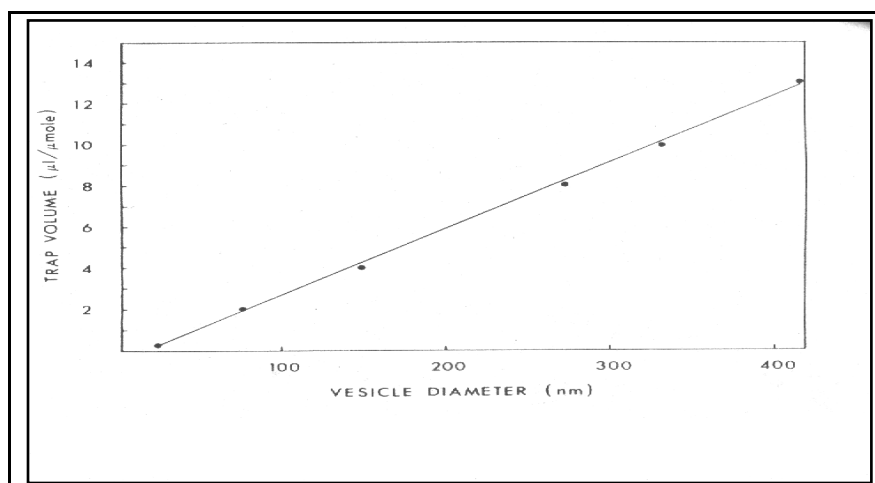


Abbildung 2.16 Eine Darstellung des berechneten Einschlussvolumens ( $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  Phospholipid) gegen den mittleren Durchmesser einer LUV-Gruppe. Zur Berechnung wurde eine Gaußsche Partikelgrößenverteilung mit einer Spannweite von 40 nm angenommen. Ein Platzbedarf von  $0,7 \text{ nm}^2$  für ein Phospholipidmolekül und eine Doppelschichtdicke von 4 nm wird für jedes Liposom vorausgesetzt. modifiziert nach [112].



---

### 2.5.5 Beladung der Liposomen

Für einen Gebrauch als Arzneistoffträger ist neben einer genauen Charakterisierung der Liposomen eine effektive Beladung mit dem Arzneistoff nötig, d.h. es muss ein möglichst hoher Anteil des Wirkstoffes eingeschlossen werden [81].

Dabei werden zur Optimierung der Beladungseffektivität zwei Methoden verwendet: pH-Gradienten- [81] und Calciumacetat-Methode [114], wobei die Beladung entlang eines  $H^+$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Gradienten erfolgt. So können neben schwachen Säuren und Basen auch amphiphile basische Amine mit höherer Effektivität verkapselt werden.

Da die Beladung nie vollständig erfolgt, muss der freie vom verkapselten Arzneistoff getrennt werden. Dieses ist mit mehreren Verfahren möglich [57]:

- Minisäulenzentrifugation
- Protamin-Aggregation

Die Abtrennung des unverkapselten Arzneistoffs erfolgt also durch Bindung an die Säule oder über Komplexbildung mit Protamin und anschließender Ausfällung dieses Komplexes.

### 2.5.6 Stabilität der Liposomen

Neben der Vesikelgröße und dem eingeschlossenen Volumen spielt der Verlust von eingeschlossenem Arzneistoff eine große Rolle. Dabei diffundiert der Arzneistoff durch die Lipidmembran. Hierbei zeigen die Arzneistoffe mit Zunahme des Öl/Wasser-Verteilungskoeffizienten eine Steigerung der Diffusionsgeschwindigkeit. Für hydrophile Arzneistoffe bedeutet dieses, dass dieser Vorgang stark temperaturabhängig ist, da sie auf Grund ihres niedrigen Öl/Wasser-Verteilungskoeffizienten eine große Energiemenge benötigen (geliefert durch thermische Energie), um die lipophile Membran zu überwinden [115].

Die Instabilität von Liposomen hinsichtlich des Verlustes des eingeschlossenen Arzneistoffs ist schon lange bekannt. Daher wurden zahlreiche Variationen getestet, um die Stabilität der Liposomen zu erhöhen.

Hierbei wurden folgende Ansätze verfolgt [57]:

1. Verwendung polymerisierender Phospholipide
2. Auswahl der Lipide
3. Bindung von Proteinen an die Außenfläche
4. Cholesterolzusatz

Daneben wird auch die sterische Stabilisierung der Liposomen erwähnt [116].

Den unter 1 aufgeführten Ansatz verfolgt die Stabilitätserhöhung durch einen Ersatz der natürlichen Lipide durch synthetische Lipide, die durch Polymerisation stabilisiert werden können [117]. Dazu verwendet man das polymerisierbare Sulfolipid: N,N-(bis-(2-hexacosa-10,12-diin-1-oyloxiethyl))-2-amino-ethanolsulfonsäure. Hiermit können verschiedene Anzahlen von Doppelschichten in den Liposomen realisiert werden (siehe Abbildung 2.17).

Die zweite Möglichkeit zur Erhöhung der Stabilität ist eine Verwendung von Lecithin mit längerkettigen Fettsäuren und/oder gesättigten Fettsäuren bei der Herstellung von Liposomen [14].

Als drittes kann ein Liposom durch Bindung von Proteinen an die Oberfläche stabilisiert werden, da es so von immunkompetenten Zellen nicht als fremd erkannt und attackiert wird, sodass seine Verweildauer im Plasma in intakter Form erhöht wird.

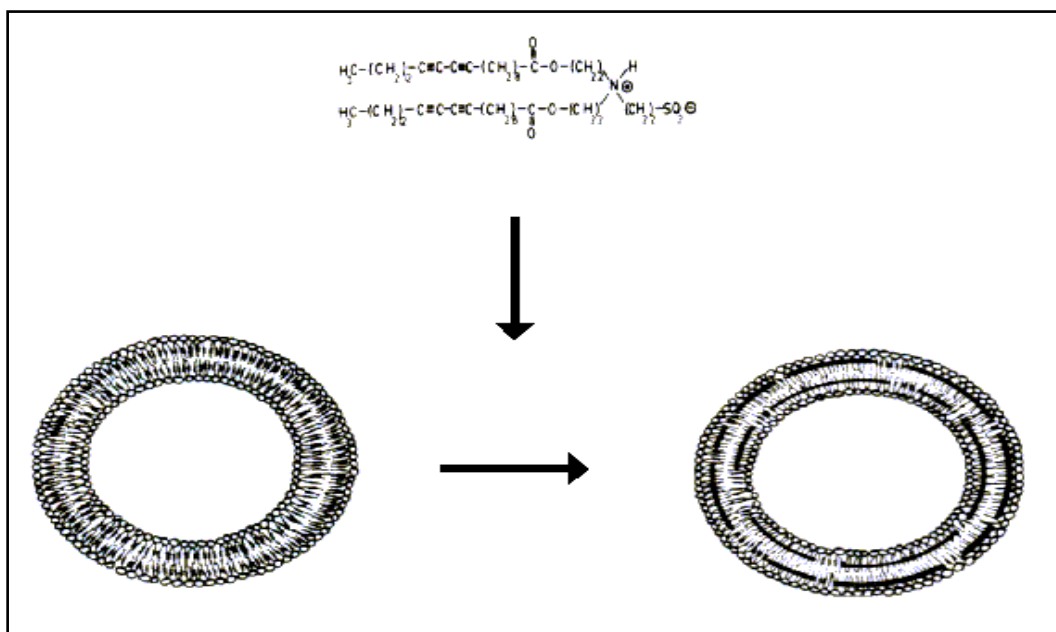


Abbildung 2.17 Erzeugung von Vesikeln unter Verwendung des polymerisierbaren Sulfolipids N,N-(bis-(2-hexacosa-10,12-diin-1-oyloxiethyl))-2-aminoethanolsulfonsäure [117]

---

Der Zusatz von Cholesterol sorgt für eine größere Stabilität der Liposomen [14, 57, 104]. Er wirkt auf unterschiedliche Weise. Erstens kommt es zu einer Abnahme der Fluidität bzw. Mikroviskosität der Membran. Zweitens wird die Permeabilität der Membran für wasserlösliche Moleküle erniedrigt. Drittens kommt es zu einer Stabilisierung der Membran gegenüber biologischen Flüssigkeiten, wie Plasma [14].

Diese Wirkungen werden erreicht, indem durch die Zugabe von Cholesterol die kohäsiven Kräfte benachbarter Lipidketten in den Liposomen reduziert werden [104].

Auch die sterische Stabilisierung führt zu einer Erhöhung der Stabilität. Hierbei wird die Doppelschicht durch den Zusatz von Polysorbat 80 stabilisiert [116].

Für die Stabilität der Liposomen spielt die Aufenthaltszeit im Blutplasma eine entscheidende Rolle. Sie verhält sich bei Liposomen umgekehrt proportional zur Cholesterolkonzentration [118].

Neben den bereits genannten Möglichkeiten, stabilere Liposomen zu erzeugen, wurde auch die Oberflächenladung der Liposomen modifiziert. Im Gegensatz zu negativ geladenen Vesikeln verbleiben positiv geladene oder neutrale Liposomen mehrere Stunden im Blut. Dadurch wird eine frühzeitige Metabolisierung in Leber oder Milz vermieden [119]. Maximal stabilisierte Liposomen mit einer sehr langsamen Freigabe sind aber nur dann sinnvoll einsetzbar, wenn ein niedriger Wirkspiegel über einen langen Zeitraum aufrechterhalten werden soll. Sie sind ungeeignet, wenn kurzfristig hohe Arzneistoffkonzentrationen notwendig sind [75].

Nicht stabilisierte Liposomen werden schnell von den Phagozyten als körperfremd erkannt und aus dem Blut entfernt (z.B. durch Phagozytose oder Speicherung in Lysosomen (siehe Abbildung 2.18)).

Neben der Aufnahme der Liposomen durch die Phagozyten erfolgen im Plasma weitere Abbaureaktionen. So kommt es zu einer Assoziation der Liposomen mit HDL-Vesikeln. Dieses bewirkt einen Austausch von Phosphatidylcholin zwischen dem Liposom und dem HDL-Vesikel. Dieser Austausch verläuft allerdings nur in eine Richtung, von den Liposomen zu den HDL-Vesikeln. Der Verlust des Phospholipids aus den Liposomen führt dann, über eine verminderte Wandstabilität, zu einem massiven Verlust des eingeschlossenen Arzneistoffs.

Weiterhin interagieren Liposomen noch mit Komplementfaktoren, deren Zusammenwirken zur Bildung einer etwa 10 nm großen, porenähnlichen Struktur in der Wand der Liposomen führt, dem sogenannten membran-angreifenden Komplex (MAC). Durch diesen kommt es zu einer Freigabe des Inhalts der Liposomen. Die Wechselwirkungen zwischen den Liposomen und dem Komplementsystem können detailliert bei Szebeni nachgelesen werden [120], während von Senior [121] und Ishida et al. [122] sämtliche Abbaureaktionen, die bei Kontakt der Liposomen mit Blut ablaufen, detailliert zusammengefasst werden. Da intravenös applizierte Liposomen direkt ins Plasma gelangen, wird ihre Verwendbarkeit besonders durch diese Effekte begrenzt. Erst die Steigerung der Stabilität im Blut, d.h. die Verlängerung der Aufenthaltszeit im Blut, ermöglicht es den Liposomen, den im Drug Targeting angestrebten Wirkort zu erreichen.

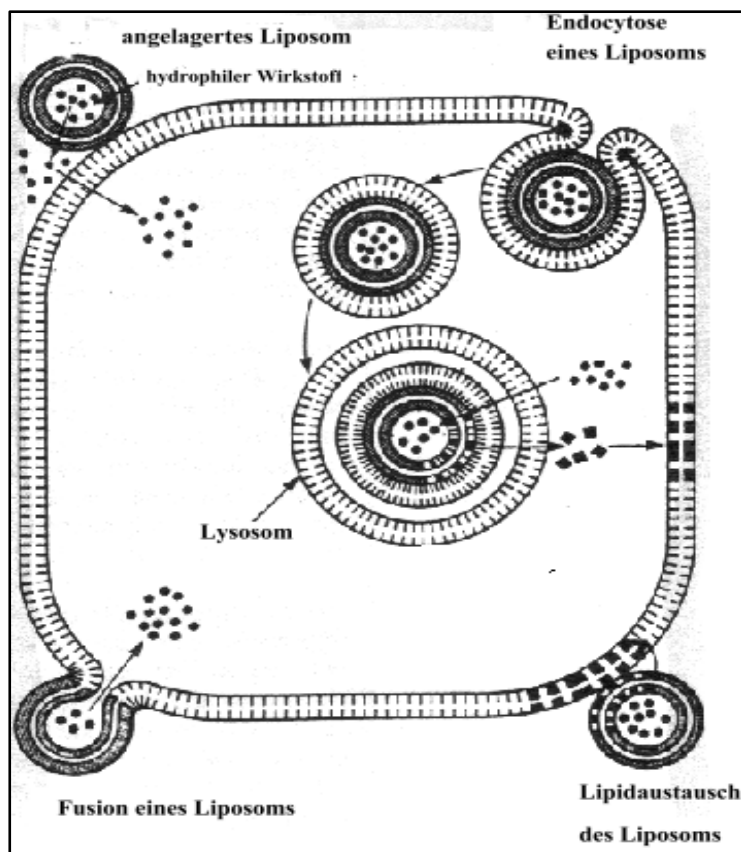


Abbildung 2.18  
Die verschiedenen Arten der  
Resorption von Liposomen  
(modifiziert nach [111])

---

## 2.5.7 Freisetzung aus Liposomen

Die Freisetzung am Wirkort erfolgt als Zusammenspiel von drei Prozessen [57]:

- Passive Diffusion des Arzneistoffes durch die Liposomenmembran
- Störung der Liposomenwand durch intrazelluläre und/oder extrazelluläre Proteine des Wirkortes
- Enzymatischer Abbau der Liposomenmembran

Wie auch die Stabilität hängt der Anteil des freigesetzten Arzneistoffes von der Größe und der Ladung der Vesikel ab [57].

Neben den eben erwähnten Parametern spielt auch die Applikationsart eine große Rolle [123].

## 2.5.8 Lagerstabilität

Die Stabilität ist nicht nur für die Widerstandsfähigkeit der Liposomen im Blutkreislauf, sondern auch für die Lagerung wichtig. Für die Verwendung von Liposomen in Arzneizubereitungen ist häufig die Lagerstabilität der limitierende Faktor [14], wobei mindestens eine Stabilität von 1,5 bis 2 Jahren bei 4 °C nötig, bei OTC-Produkten sogar bei 20 °C [57]. Bei der Stabilität von Liposomen gilt es zwei Hauptaspekte zu beachten: die chemische und die physikalische Stabilität.

Die chemische Stabilität hängt von den eingesetzten Substanzen ab. Die wichtigsten die Stabilität der Fette beeinträchtigenden Prozesse sind: Peroxidation vor allem der ungesättigten Fettsäuren und Hydrolyse [100].

Physikalische Stabilität betrachtet die Integrität der Struktur der Liposomen [70]

Des Weiteren kann man noch die mikrobiologische Stabilität betrachten [123].

---

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Arzneistoffe

##### 3.1.1.1 Lidocain-Hydrochlorid

Lidocain-Hydrochlorid war ein feines Pulver von weißer Farbe und wurde ohne weitere Bearbeitung eingesetzt. Lidocain-Hydrochlorid wurde entweder bei Sigma-Aldrich (D-Steinheim) bestellt, oder freundlicherweise von Firma ASTRA (D-Wedel) zur Verfügung gestellt. Die im Weiteren verwendeten Angaben in Prozent sind Massenprozent.

##### 3.1.1.2 Xylocain® 2 % (m/V)

Es handelt sich hierbei um eine 2 %-ige Lidocain-HCl Lösung (5 ml pro Ampulle). Diese enthält neben Lidocain-HCl noch Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Wasser für Injektionszwecke. Vor der Weiterverarbeitung wurde Xylocain® 2 % 1:1 mit Wasser verdünnt, sodass eine 1 %-ige Lösung resultierte.

##### 3.1.1.3 Prilocain-Hydrochlorid

Prilocain-Hydrochlorid war ein adhäsives weißes Pulver. Es wurde ohne weitere Bearbeitung eingesetzt. Prilocain-Hydrochlorid wurde entweder bei Sigma-Aldrich (D-Steinheim) bestellt, oder freundlicherweise von Firma ASTRA (D-Wedel) zur Verfügung gestellt. Die im Weiteren verwendeten Angaben in Prozent sind Massenprozent.

##### 3.1.1.4 Xylonest® 1 % (m/V)

Es handelt sich hierbei um eine 1 %-ige Prilocain-HCl Lösung (10 ml pro Ampulle). Diese enthält neben Prilocain-HCl noch Natriumchlorid, Natriumhydroxid und Wasser für Injektionszwecke.

### 3.1.1.5 Propofol-Emulsion

Die Propofol-Emulsion ist eine O/W-Emulsion mit Lecithin als Emulgator. Laut Gebrauchsinformation wird zur Vermeidung des Injektionsschmerzes bei einer intravenösen Verabreichung eine Mischung im Verhältnis von 20 Teilen der Propofol-Emulsion mit einem Teil einer Lokalanästhetika-Lösung vorgeschlagen. In der Packungsbeilage wird hierzu die Verwendung einer Lösung von Lidocain-HCl empfohlen.

Folgende Propofol-Emulsionen verschiedener Hersteller wurden verwendet: Propofol Abbott 1 % (Abbott GmbH, D-Wiesbaden), Disoprivan<sup>®</sup> 1 % (Zeneca GmbH, D-Schwetzingen), Propofol 1 % Fresenius (Fresenius AG, D-Bad Homburg), Propofol 1 % Parke-Davis<sup>®</sup> (Parke-Davies GmbH, D-Berlin), Klimofol<sup>®</sup> (IVAMED Arzneimittel GmbH, D-Mannheim) (Tabelle 3.1).

<b>Zubereitung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Disoprivan <sup>®</sup> 1 %, Zeneca GmbH Charge: A 90365 A A 90792 A	Sojabohnenöl (3-sn-Phosphatidyl)cholin Glycerol
Propofol Abbott 1 % Charge: 49-943-27 57-909-27	Sojabohnenöl Glycerol 85 % Eilecithin
Propofol 1 % Parke-Davis <sup>®</sup> Charge: 99 A 26	Glycerol Ölsäure (3-sn-Phosphatidyl)cholin Sojabohnenöl
Propofol 1 % Fresenius Charge: KE 156 LF 168 W	Sojabohnenöl Eilecithin Glycerol Ölsäure
Klimofol <sup>®</sup> 1 %, IVAMED Arzneimittel GmbH	Sojabohnenöl (3-sn-Phosphatidyl)cholin Glycerol

Tabelle 3.1 Bestandteile der Propofolzubereitungen neben 10 mg/ml Propofol, Natriumhydroxid und Wasser für Injektionszwecke [124]

### 3.1.2 Hilfsstoffe

#### 3.1.2.1 Phospholipon® 90 G (Lecithin)

Phospholipon® 90 G wurde von der Firma Rhône Poulenc Rorer Nattermann (D-Köln) zur Verfügung gestellt. Bei Phospholipon® 90 G handelt es sich um hochgereinigtes Sojalecithin. Die genauen Inhaltsstoffe und die Aufschlüsselung der Fettsäurezusammensetzung können Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 entnommen werden [125].

Komponente	Anteil (m/m)
Phosphatidylcholin	$93 \pm 3 \%$
Lysophosphatidylcholin	$3 \pm 3 \%$
Wasser	max. 1,5 %

Tabelle 3.2 Zusammensetzung von Phospholipon® 90 G

Fettsäure	Anteil (m/m)
Palmitinsäure	$12,2 \pm 2 \%$
Stearinsäure	$3 \pm 1 \%$
Ölsäure	$10,0 \pm 3 \%$
Linolsäure	$66,5 \pm 5 \%$
Linolensäure	$5 \pm 2 \%$

Tabelle 3.3 Fettsäurespektrum von Phospholipon® 90 G

### 3.1.3 Wasser

Wasser, welches mit der Probe in Berührung kam, wurde ausschließlich in doppelt destillierter Qualität eingesetzt.



---

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Herstellung der Proben**

#### **3.2.1.1 Herstellung arzneistofffreier Liposomen**

Die Probenherstellung erfolgte, indem zuerst das Lecithin bei Raumtemperatur in Wasser dispergiert wurde. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurden die Proben während dieser Zeit mit 500 Umdrehungen pro Minute gerührt. Die Dispergierung wurde erst beendet, nachdem keine Fettpartikel mehr zu sehen waren. Die dazu notwendige Zeit betrug in Abhängigkeit von dem Ansatz bis zu 18 Stunden. Anschließend wurden die Proben einer Ultraschallbehandlung mit dem Soniprep® 150 MSE Ultraschall Disintegrator (MSE Scientific Instruments, GB-Crawly) (Amplitude 16 µm) ausgesetzt.

Die sehr geringe Löslichkeit von Lecithin in Wasser erlaubt die Annahme, dass sämtliches Lecithin zur Formation von Vesikeln herangezogen wurde.

#### **3.2.1.2 Herstellung arzneistoffhaltiger Liposomen**

**Die Herstellung arzneistoffhaltiger Liposomen erfolgte wie unter 3.2.1.1 beschrieben, wobei der Arzneistoff vor dem Dispergieren in der wässrigen Phase gelöst wurde.**

### **3.2.2 Mischungen der Fertigarzneimittel**

Die Mischungen der Fertigarzneimittel Xylonest® 1 % bzw. Xylocain® 2 % mit den Propofol-Emulsionen erfolgten in dem, in der Gebrauchs- und Fachinformation genannten, Verhältnis von 20 Teilen einer 1 %-igen Propofol-Emulsion und 1 Teil einer 1 %-igen Lokalanästhetika-Lösung (z.B. [126, 127]).

---

### **3.2.3 Freeze-Dried Empty Liposomes (FDEL) Methode (Rehydratation gefriergetrockneter Leerliposomen)**

Zur Herstellung von gefriergetrockneten Leerliposomen wurden zunächst analog 3.2.1.1 durch das Dispergieren von Lecithin in Wasser MLVs gebildet, die dann durch Ultraschallbehandlung in SUVs überführt wurden. Anschließend wurde die Probe nach Zusatz des Kryoprotektors Saccharose gefriergetrocknet. Nach der erforderlichen Zeit wurde die Probe rehydratisiert. Zum Rehydratisieren wurde entweder Wasser oder 1 mmol  $\text{CaCl}_2$ -Lösung verwendet.

Eine Beladung der Leerliposomen mit Lidocain-HCl erfolgte entweder vor der Ultraschallbehandlung oder bei der Rehydratation.

### **3.2.4 Phosphatbestimmung**

Die Bestimmung des Phospholipidgehalts erfolgte in Übereinstimmung mit dem Testprinzip der Testkombination “Test-Combination Phosphorus, Phospholipids” von Boehringer Mannheim GmbH (Cat.No. 124974). Die notwendigen Reagenzien wurden vom Zentralen Chemikalienlager der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt.

Das zu Grunde liegende Testprinzip nutzt die Molybdat-Vanadat-Reaktion. Nach der Oxidation der Phospholipide mit Perchlorsäure 70 % und Wasserstoffperoxid 30 % geben diese einen farbigen Komplex mit Molybdat und Vanadat in Gegenwart von Salpetersäure. Die Auswertung erfolgt dann kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Farbintensität verhält sich proportional zur Phosphatkonzentration.

---

### **3.2.5 Mikroskopische Methoden**

#### **3.2.5.1 Polarisationsmikroskopie**

Die Proben wurden mit einem Photomikroskop (Typ III, Zeiss, D-Oberkochen) betrachtet. Dazu wurden die Proben auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Betrachtung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur. Ausgewählte Proben wurden zwischen gekreuzten Polarisatoren untersucht. Um die durch optische Anisometrie in der Probe auftretenden Helligkeitsunterschiede als farbige Texturen und somit besser sichtbar darzustellen, wurde ein  $\lambda$ -Plättchen verwendet.

#### **3.2.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

Zwischen zwei Goldträgern wurden die Proben bei  $T = -210\text{ °C}$  in schmelzendem Stickstoff schockgefroren (Abkühlrate  $10^4\text{ K/s}$ ). Anschließend wurde die tiefgefrorene Probe bei  $-100\text{ °C}$  und einem verminderten Druck von  $5 \cdot 10^{-6}\text{ bar}$  im Rezipienten einer Gefrierbruchhätzanlage BAF 400 (Balzers, D-Wiesbaden) gebrochen. Die so entstandenen Bruchflächen wurden dann im Winkel von  $45^\circ$  mit einer Platin-Kohle-Schicht beschattet (Schichtdicke:  $2\text{ nm}$ ), bevor zur Stabilisierung unter einem Winkel von  $90^\circ$  eine  $20\text{ nm}$  dicke Kohleschicht aufgebracht wurde. Die erhaltenen Replika wurden erst mit einer 1:1 (V/V) Mischung aus Chloroform und Methanol und dann mit Wasser gereinigt.

Zur Untersuchung diente ein Transmissionselektronenmikroskop EM 300 (Philips, D-Kassel).

#### **3.2.6 Dynamische Differenzkalorimetrie**

Die thermoanalytischen Untersuchungen wurden mit einem Differential Scanning Calorimeter DSC 220 (Seiko, D-Neu-Isenburg) durchgeführt. Hierbei betrug die Heizrate  $5\text{ °C/min}$ . Die Probe wurde in einen unbeschichteten Aluminiumtiegel (Perkin Elmar, D-Rodgau-Jügesheim) eingewogen und gegen einen leeren Referenztiegel vermessen. Es wurde der bei dem Versuch angegebene Temperaturbereich untersucht. Die Proben wurden jeweils einmal vermessen.

---

### **3.2.7 Partikelgrößenbestimmungen**

#### **3.2.7.1 Photonenkorrelationsspektroskopie**

Zur Bestimmung der Partikelgrößen wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genutzt. Bei der PCS wird die partikelgrößenabhängige Lichtstreuung bestimmt. Die Auswertung des gemessenen Spektrums erfolgt mit Hilfe eines Autokorrelators.

Da die Intensität des Streulichts der Intensität des eingestrahlten Lichts direkt proportional ist, wird durch die Erhöhung der Laserleistung die Intensität des Streulichts erhöht (daher wurde der Messlaserstrahl des Zetasizers III mit einer Leistung von 5 mW ersetzt durch einen externen Laser gleicher Wellenlänge mit der Leistung 35 mW).

Aus der erhaltenen Verteilung kann dann der Mittelwert (z-average) und die Streuung (Polydispersitätsindex) abgelesen werden. Hier gilt es zu beachten, dass die z-average Partikelgröße einen mittleren intensitätsgewichteten Partikeldurchmesser darstellt, der die wahre Partikelgröße nur unter den Voraussetzungen von Monodispersität und Monomodalität widerspiegelt.

Der Polydispersitätsindex entspricht der Varianz der Verteilung und ist ein dimensionsloses Maß für die Breite der Verteilung [128]. Einen Polydispersitätsindex von 0.0 erhält man für eine monodisperse Dispersion, 1.0 für ein komplett heterogenes System.

Für ein möglichst gutes Messergebnis muss eine geeignete Konzentration eingestellt werden, da einerseits in der Probe eine gewisse Anzahl an Partikeln vorhanden sein muss, um ein aussagekräftiges Messergebnis zu erhalten, andererseits muss die Probe ausreichend verdünnt sein, um eine gegenseitige Beeinflussung der Partikel auszuschließen. Dazu wurden die Proben soweit verdünnt, dass im Strahlengang etwa 200.000 messbare Teilchen vorlagen.

Für Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser unter 500 nm erfolgte die Messung der Partikelgröße und deren Verteilung mit Hilfe der Laserlichtstreuung mit einem Zetasizer III (Malvern, D-Herrsching), der mit einem externen 35 mW HeNe-Laser (Spectra Physics, D-Göttingen) ausgestattet war ( $\lambda=632,8$ ). Ein Photomultiplier detektierte die Intensität des von der Probe gestreuten Laserlichts unter einem Streuwinkel von  $\theta = 90^\circ$ .

Die Proben wurden innerhalb von 120 sec 10-mal vermessen. Der Computer wählte Messungen aus und ermittelte hieraus mit Hilfe des Korrelators Malvern K 7032 CN und der Malvern Software (Version 1.1) z-average sowie den Polydispersitätsindex.

Im Unterschied zu den frisch hergestellten Proben, die bei 25 °C vermessen wurden, erfolgte die Vermessung der Lagerproben bei 20 °C.

Zur Bestimmung von Partikeln, deren hydrodynamischer Durchmesser größer als 500 nm war, wurde der Mastersizer MS 20 (Malvern, D-Herrsching) genutzt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines 5 mW HeNe-Lasers bei  $\lambda = 632,8$  nm. Zur Auswertung wurden die Modelle nach Fraunhofer und Mie genutzt.

### **3.2.7.2 LS 13 320**

Das LS 13320 (Beckman Coulter, D-Krefeld) wurde ebenfalls zur Partikelgrößenbestimmung eingesetzt.

Es erlaubt die Bestimmung der Partikelgröße in einem Bereich von 40 nm - 2000  $\mu$ m, dazu werden zur Partikelgrößenmessung neben den Daten, die nach dem Laserbeugungsprinzip aufgenommen werden, auch die Daten, die mit Hilfe der PIDS (Polarisation Intensity Differential Scattering) -Technologie ermittelt werden, berücksichtigt.

Die PIDS-Technologie beruht darauf, dass Submikronpartikel in polarisiertem Streulicht verschiedener Wellenlänge unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Die Analyse erfolgt unter sechs verschiedenen Winkeln (zwischen 0 – 146°), mit Licht in drei Wellenlängen (450, 600 und 900 nm), das jeweils horizontal bzw. vertikal polarisiert ist. Man erhält so einen Rohdatensatz, aus dem die Software die entsprechende Größenverteilung errechnet.

## **3.2.8 Röntgenmessungen**

Es wurde die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) als Messmethode genutzt.

Die Röntgenkleinwinkelstreuungsuntersuchungen wurden mit einem Kratky-Kompakt-Kleinwinkelsystem KCLC (Anton Paar, A-Graz) durchgeführt. Die Kratky-Kamera war auf einem PW 1830 (Philips, D-Kassel), der mit einer Kratky-Breitfokusröhre PW 2253/11 (Philips, D-Kassel) ausgestattet war, installiert. An dem Generator lag ein Anodenstrom  $I = 40$  mA und eine Beschleunigungsspannung  $U = 40$  kV an. Mit Hilfe eines ortsempfindlichen Detektors OED-50M (MBraun, D-Garching) wurde die gestreute Intensität vermessen und über den Verstärker PSD-50M (MBraun, D-Garching) sowie den Analog-Digital-Wandler ADC

(MBraun, D-Garching) einem Computer zugeführt und mit der Software MCD Version 1.90 (MBraun, D-Garching) aufgezeichnet. Die Proben wurden in einer Kapillare bei einer Temperatur von  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  vermessen. Die Messung erfolgte in einer druckverminderten Probenkammer ( $p=10^{-2}$  Torr) über einen Messzeitraum von  $t=3600$  s.

Aus dem Streuvektor wurde mittels der Braggschen Gleichung der Netzebenenabstands ermittelt.

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta = \frac{hd\lambda}{2\pi} \Rightarrow d = \frac{2\pi n}{h} \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

wobei  $n$  die Ordnung der Beugungsmaxima,  $\lambda$  die Wellenlänge des Röntgenstrahls,  $d$  der Netzebenenabstand,  $h$  der Streuvektor und  $\theta$  der Streuwinkel ist.

Aus geometrischen Gründen wird das Beugungsmaximum nach dem Glätten der Streukurve zu höheren Beugungswinkeln verschoben, sodass für die Wiederholungsdistanz  $d$  kleinere Werte gefunden werden.

### 3.2.9 Messungen des Zetapotentials

Die Mobilität der Partikel im elektrischen Feld kann mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt werden. Für die Bestimmung des Zetapotentials wurde der Zetasizer III (Malvern, D-Herrsching), bestückt mit der Mikroelektrophoresezelle AZ4, verwendet. Zur Messung der Mobilität der Partikel wurde der Kreuzstrahlbetrieb des Lasers mit einer Modulationsfrequenz von 1000 Hz und einer angelegten Spannung von 150 V genutzt. Eine 0,001 M NaCl-Lösung pH 7 diente einmal zum Verdünnen der Proben, zum Zweiten zur Überprüfung der Versuchsanordnung. Die Probe wurde dreimal vermessen und der Mittelwert errechnet.

---

## 3.2.10 Spektroskopische Methoden

### 3.2.10.1 NMR-Spektroskopie

In der Kernresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)) wird das Verhalten von Atomkernen in Magnetfeldern untersucht. Für die Atomkerne gibt es zwei verschiedene Zustände: energiearm und energiereich. Die durch das Magnetfeld zugeführte Energie kann nun von den Atomen in den energiearmen Zuständen dazu genutzt werden, energiereiche Zustände zu erlangen. Dabei nehmen die Atomkerne genau die Energie auf, die der Überführung in den energiereichen Zustand entspricht. Dadurch erhält man das Kernresonanzspektrum. Je nach betrachtetem Atom kann man unterscheiden in  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie.

Nach der Larmor-Gleichung  $\omega = \gamma \cdot H_0$  ( $H_0$  Feldstärke des angelegten Magnetfelds,  $\gamma$  ist das gyromagnetische Verhältnis) ist die Präzessionsfrequenz  $\omega$  eines Atoms von der Stärke des äußeren Magnetfelds abhängig.

Entscheidend ist aber nicht die Feldstärke des angelegten Magnetfelds ( $H_0$ ), sondern die am Wirkort tatsächlich vorherrschende effektive Feldstärke ( $H_{\text{eff}}$ ). Diese kann, je nach Elektronendichte der Umgebung, gegenüber  $H_0$  abgeschwächt oder verstärkt sein. Es können so Interaktionen untersucht werden, da eine Veränderung der Elektronendichte, z.B. durch Wasserstoffbrückenbindungen, eine chemische Verschiebung induziert.

Die Proben wurden mit einem Bruker DRX 200 NMR-Spektrometer (Bruker GmbH, D-Rheinstetten) kernresonanzspektroskopisch untersucht. Als Probengefäße dienten Wilmad NMR-Röhrchen (RototecSpintec GmbH, D-Darmstadt). Die Proben für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie,  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen zur Bestimmung der Liposomen-Lamellarität wurden mit  $\text{D}_2\text{O}$  hergestellt. Die sonstigen Proben für die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie wurden nach Herstellung 1:1 (g/g) mit  $\text{D}_2\text{O}$  verdünnt.

---

### **3.2.10.2 Infrarot-Spektroskopie**

Aus einem Infrarot-Spektrum (IR-Spektrum) kann die von Molekülen aufgenommene Energie abgelesen werden. Aus dem Energiebedarf der jeweiligen Molekülschwingung ergibt sich, welcher Wellenzahl die absorbierte Infrarotstrahlung entspricht. Dieser Energiebedarf hängt unter anderem von der Stärke der Bindung ab. Durch Vergleich des Spektrums der Formulierung mit den Spektren der Einzelsubstanzen kann das Verhalten der Formulierung beurteilt werden. Verschiebungen der Absorptionsbanden oder Änderungen im Verhältnis ihrer Intensitäten deuten auf Interaktionen. Bei fehlender Interaktion zeigt sich das Spektrum der Mischung als Addition der Spektren der Einzelsubstanzen.

Bei der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) wird die Probe nicht mit monochromatischer Strahlung ansteigender Wellenlänge, sondern von der gesamten Strahlung der Lichtquelle durchstrahlt. Man misst dann ein Interferogramm, welches durch Fourier-Transformation in ein normales IR-Spektrum überführt werden kann.

Zur Messung der FT-IR diene ein Mattson Genesis FT-IR-Spektrometer (Mattson ATI Instruments, USA-Wisconsin). Die gefriergetrocknete Probe wurde mit KBr fein verrieben und dann verpresst. Der so erhaltene Pressling wurde dann in den Strahlengang eingebracht.

### **3.2.11 Fluoreszenzmessungen**

#### **3.2.11.1 Verwendung von 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS)**

##### **3.2.11.1.1 Bestimmung der Arzneistoffbindung im hydrophilen Bereich**

Die Bindung von Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl an den polaren Teil des Phospholipidmoleküls wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1-Anilino-8-naphthalensulfonat ((ANS) Aldrich Chemie (D-Steinheim)) untersucht. ANS zeigt nur eine schwache Fluoreszenz in wässrigen Lösungen. Die Fluoreszenzintensität steigt, wenn ANS an die polaren Kopfgruppen von Phospholipiden gebunden ist.

Zur Messung der Bindung im hydrophilen Bereich wurden alle Komponenten zusammengegeben, sodass eine Konzentration an Phospholipid von 1 mmol/l, an ANS von 10 µmol/l und Arzneistoffkonzentrationen bis 3,0 mmol/l resultierten.



Dieser Ansatz wurde dann bei 50 °C für eine Stunde auf einem Magnetrührer (500 U/min.) gerührt. Nach diesem Zeitraum wurde die Probe direkt am F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi, J-Tokyo) mit einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge 480 nm fluoreszenzphotometrisch vermessen.

Die Fluoreszenzintensität des binären Systems ANS und Phospholipon wurde als 100 % gesetzt. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde anhand einer Dreipunktkalibrierung überprüft.

Die möglichen Veränderungen der Fluoreszenz durch Wechselwirkungen zwischen ANS und Lokalanästhetikum wurden berücksichtigt.

### **3.2.11.1.2 Detektion von Interaktionen mittels des Fluoreszenzfarbstoffs 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS)**

Wie oben erwähnt zeigt der Fluoreszenzfarbstoff ANS in einer wässrigen Lösung nur eine geringe Fluoreszenzintensität. Diese steigt jedoch stark an, wenn das ANS an das Phospholipid gebunden wird. Sie steigt dabei um so stärker, je stärker die negative Ladung am Sauerstoff der Phosphatgruppe des Lecithins durch die Bindung eines Arzneistoffs verringert wird. Daher kann die Intensitätsänderung der Fluoreszenz als Indikator für die Wechselwirkungen zwischen Lecithin und Arzneistoff dienen.

Zur Erfassung der Phospholipid-Lokalanästhetika-Interaktionen, wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität in dem ternären System ANS, Lecithin und Lokalanästhetikum (Lidocain-HCl und Prilocain-HCl) gegenüber dem binären System ANS, Lecithin untersucht. Dazu wurde zuerst die Fluoreszenzintensität im binären System ANS und Phospholipon vermessen. Dieses erfolgte bei einer konstanten Phospholiponkonzentration von 1 mmol/l, während die Konzentration an ANS variierte (zwischen 0 und 2,32 µmol/l).

In dem ternären Gemisch wurde dann die Konzentration an Phospholipon (1 mmol/l) und der Lokalanästhetika (Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl jeweils 1 mmol/l) konstant gehalten, während die Konzentration an ANS variierte (zwischen 0 und 2,32 µmol/l).

Die Fluoreszenz wurde gemessen bei einer Wellenlänge von 480 nm, nachdem die Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm erfolgt war.

---

### **3.2.11.2 Verwendung von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)**

#### **3.2.11.2.1 Bestimmung der Arzneistoffbindung im lipophilen Bereich**

Eine Bindung von Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl innerhalb des lipophilen Bereiches der Phospholipidliposomen sollte durch die Verdrängung des ebenfalls in diesem Bereich bindenden Fluoreszenzfarbstoffs 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien ((DPH) Aldrich Chemie (D-Steinheim)) verfolgt werden.

Da DPH nahezu wasserunlöslich ist, kann seine Einlagerung in den lipophilen Bereich der Liposomen angenommen [129] und somit eine Aussage über die Arzneistoffbindung im lipophilen Bereich getroffen werden.

Die Herstellung von DPH-haltigen Liposomen erfolgte nach der Filmbildungsmethode. In 2 ml einer DPH-haltigen Stammlösung in Tetrahydrofuran (44 µmol/l) wurde Phospholipon<sup>®</sup> 90 G (20 mmol/l) gelöst. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurde anschließend das organische Lösemittel abgezogen und der daraus resultierende Film in 20,00 ml Wasser dispergiert. Diese Dispersion wurde im Verhältnis 1:1 mit einer Lösung des Arzneistoffes versetzt, sodass Arzneistoffkonzentrationen bis 3,0 mmol/l resultierten. Die Proben wurden, nachdem sie eine Stunde bei 50 °C mittels eines Magnetrührers (500 U/min) gerührt worden waren, direkt in einem F-4500 Fluorescence Spectrometer (Hitachi, J-Tokyo) vermessen. Die Anregung erfolgte hierbei bei einer Wellenlänge von 368 nm, die Emission bei einer Wellenlänge von 445 nm. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde anhand einer Dreipunktkalibrierung überprüft.

#### **3.2.11.2.2 Untersuchung zum Assoziationsvermögen von Lokalanästhetika mittels des Fluoreszenzfarbstoffs 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)**

Nicht nur das Bindungsverhalten von Arzneistoffen, sondern auch die kritische Mizellkonzentration (KMK) assoziierfähiger Tenside kann mit Hilfe von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) bestimmt werden, da die Fluoreszenzintensität des sehr schwer wasserlöslichen DPHs oberhalb der KMK, durch Aufnahme in den hydrophoben Raum im Inneren der entstehenden Mizellen sehr stark zunimmt.

Es wurde dazu eine Stammlösung von 10 mmol/l DPH in Tetrahydrofuran hergestellt. Diese wurde zu einer wässrigen Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Lokalanästhetika gegeben, sodass eine Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  DPH resultierte.

Diese Proben äquilibrierten in der Dunkelheit für etwa 17 Stunden. Danach wurden sie bei Raumtemperatur in einem F-4500 Fluorescence Spectrometer (Hitachi, J-Tokyo) vermessen. Die Anregung erfolgte hierbei bei einer Wellenlänge von 355 nm, die Emission bei einer Wellenlänge von 428 nm [130].

### **3.2.12 Bestimmung der Oberflächenspannung**

#### **3.2.12.1 Ring-Tensiometer**

Die Oberflächenspannung wurde mit einem Interfacialtensiometer K12 (Krüss, D-Hamburg), beruhend auf der Theorie von Lecomte du Noüy, gemessen. Es war ausgestattet mit einem Platin-Iridium-Ring. Die Temperatur der vermessenen Lösung war  $20 \pm 0.3$  °C. Unterschiedliche Lokalanästhetikakonzentrationen wurden durch Verdünnung einer konzentrierten wässrigen Arzneistofflösung erreicht. Nach der jeweiligen Wasserzugabe wurde eine Minute mit Hilfe eines Magnetrührers (5 U/sec) gerührt und dem System fünf Minuten Ausgleichszeit gegeben. Das Volumen der Probe war dann zwischen 18 und 20 ml.

Für die Mischung mit der Propofol-Emulsion wurde eine 1 %-ige Lösung des entsprechenden Lokalanästhetikums hergestellt und mit der Propofol-Emulsion in dem in der Gebrauchsinformation angegebenen Verhältnis von 20:1 (Propofol-Emulsion : Lokalanästhetika-Lösung) gemischt. Die Oberflächenspannung wurde direkt und abermals nach 20 h gemessen.

#### **3.2.12.2 Stalagmometer**

Unterschiedlich konzentrierte Lösungen der Lokalanästhetika wurden bei Raumtemperatur (20 °C) vermessen. Es wurde die Anzahl von Tropfen  $n$  bestimmt, die ein definiertes Volumen (1 ml) ergibt (Die Anzahl der Tropfen wurde dreimal ermittelt, und der Mittelwert daraus wurde weiterverwendet).

Die Oberflächenspannung kann dann nach Gleichung 3.2 ermittelt werden,

$$\sigma = \rho * k * l / n \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

wobei  $\sigma$  die Oberflächenspannung,  $\rho$  die Dichte und  $k$  eine Gerätekonstante ist (die durch die Messung einer Flüssigkeit bekannter Oberflächenspannung (z.B. Wasser) ermittelt werden kann).

Um die Dichte zu erhalten, wurde 1 ml der Lösung gewogen. Nach zehnfacher Wiederholung, wurde hieraus der Mittelwert ermittelt und weiter verwendet.

### 3.2.13 Solubilisationsuntersuchungen

Zur Messung wurden 3 mg Sudan B (Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden) in jeweils 2 ml Lokalanästhetika-Lösung unterschiedlicher Konzentration dispergiert. Die Probe wurde dann für 24 Stunden gerührt. Auch nach 24 Stunden war immer noch nicht solubilisierter Farbstoff zu erkennen, sodass man davon ausgehen kann, dass ein Überschuss an Farbstoff vorlag. Dieser wurde durch einen 0,22  $\mu\text{m}$  Filter abgetrennt, bevor die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge  $\lambda = 510 \text{ nm}$  mit einem UV-210 A Spektrometer (Shimadzu, J-Kyoto) vermessen wurde.

Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde anhand einer Dreipunktkalibrierung überprüft. Jede Probe wurde dreimal vermessen und deren Mittelwert errechnet.

### 3.2.14 Bestimmung des Arzneistoffbeladungsgrads von liposomalen Systemen

Zur Bestimmung des Beladungsgrads der Liposomen mit Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl wurde der freie, ungebundene Arzneistoffanteil photometrisch bestimmt und hieraus dann durch Differenzbildung auf den inkorporierten Anteil geschlossen. Dazu wurde eine Gleichgewichtsdialyse durchgeführt, indem 2 ml der Probe in einem Spectropor<sup>®</sup> Dialyseschlauch (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles) mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 6000-8000 Dalton bei Raumtemperatur für 14 Stunden gegen etwa

200 ml (das Volumen wurde genau bestimmt) Wasser dialysiert wurden. Dabei wurde das Akzeptormedium für 12 h –beginnend nach 1 h– gerührt.

Der Arzneistoffgehalt der wässrigen Phase wurde anschließend entweder direkt oder nach Auftrennung mittels HPLC spektralphotometrisch bestimmt.

Da im Dialysezeitraum von 14 h aus einem offenen Gefäß eine deutliche Menge Akzeptor verdunstet (Abbildung. 3.1), wurden fortan geschlossene Gefäße genutzt.

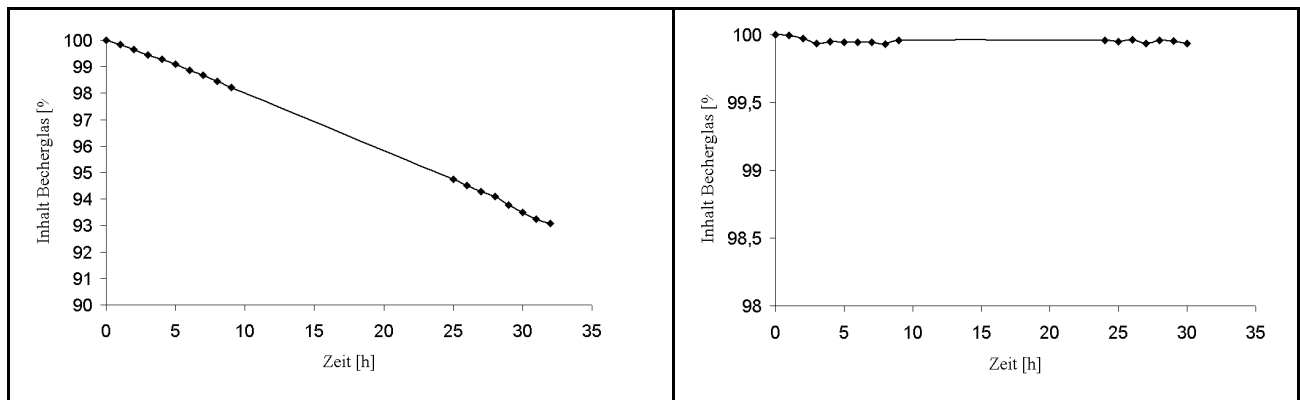


Abbildung 3.1 Das Volumen des Akzeptormedium (Wasser) in Abhängigkeit von der Zeit

links: in einem offenen Gefäß, rechts: in einem geschlossenem Gefäß.

### 3.2.15 UV/VIS-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren von wässrigen, ternären Mischungen aus Lecithin und Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl wurden mit Hilfe eines UV 240 Spektrometers (Shimadzu, J-Kyoto) im Wellenlängenbereich 190 nm – 700 nm aufgenommen.

Die Lidocain-HCl-Lösungen wurden mit Hilfe eines UV-210 A Spektrometers (Shimadzu, J-Kyoto) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 263$  nm vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kalibriergeraden. Die Kalibrierung erfasste einen Messbereich vom Ursprung bis zu einer Lidocain-HCl Konzentration von 360  $\mu\text{g/ml}$ . Für diesen Messbereich wurde die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes festgestellt.

Die Vermessung der Prilocain-HCl-Lösung erfolgte ebenfalls mit dem UV-210 A Spektrometer bei einer Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm. Zur Umrechnung der Absorption in die Konzentration diente eine Kalibriergerade. Die Kalibrierung erfasste einen Messbereich vom

---

Ursprung bis zu einer Prilocain-HCl Konzentration von 920 µg/ml. Für diesen Messbereich wurde die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes festgestellt.

### **3.2.16 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die HPLC-Analytik erfolgte mit einem Waters 515, 717 plus, 486 HPLC System (Waters, D-Eschborn). Die Säule (125 x 4 mm) war gefüllt mit Grom-Sil<sup>®</sup> 120 ODS-3 CP 5 µm (Grom, D-Herrenberg). Die mobile Phase bestand aus Acetonitril/ 0,05 % Triethylammoniumacetat in Wasser (pH=4) im Verhältnis 20/80. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min. Das Eluat wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 220$  nm vermessen.

Die Auswertung erfolgte mittels der Waters Millennium 32 Chromatography Manager software (Waters, D-Eschborn), wobei der kalibrierte Bereich von 0 bis 100 µg/ml reichte. Die Probe wurde einmal vermessen.

### **3.2.17 Lagerungsversuche**

Die Proben wurden unter drei verschiedenen Lagerbedingungen aufbewahrt. Die Stabilität der Probe wurde anhand der Veränderung des z-average und der Polydispersität beurteilt. Dabei wurde die Lagerung beendet, wenn der Polydispersitätsindex einen Wert von 0,5 überstieg.

Die Lagerung einer Probenserie erfolgte in einem Kühlbrutschrank der Firma Rumed (Rubarth Apparate GmbH, D-Laatzen) bei 4 °C.

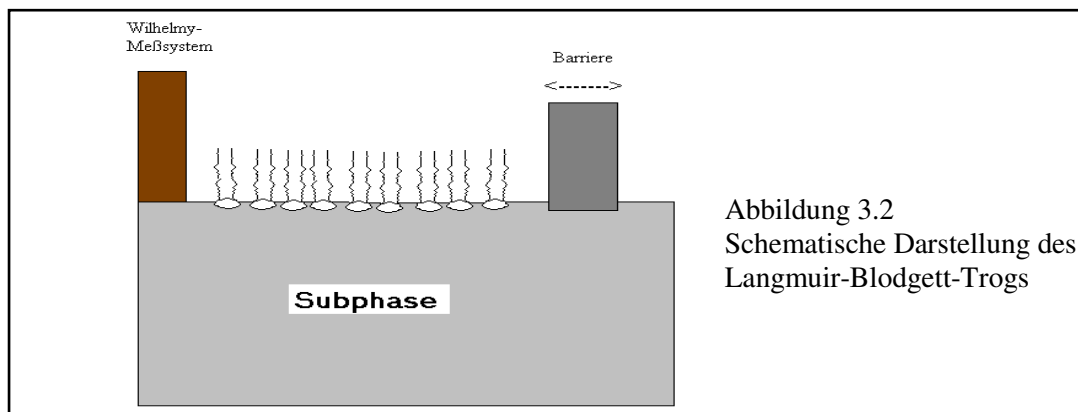
Eine weitere Probenserie wurde in einem Raum mit konstant 20 °C gelagert. Die Konstanz der Temperatur wurde mit einer Kälteanlage E+S Voigt (EF- Kälte-Klima-Technik H. und U. Frauenstein, D-Braunschweig) überwacht.

Die dritte Probenserie wurde in einem Kühlbrutschrank der Firma Rumed, (Rubarth Apparate GmbH, D-Laatzen) gelagert, dessen Temperatur von –5 °C zu 40 °C verändert wurde. Diese tägliche Temperaturschaukelung bestand aus einer Verweilzeit von jeweils 10 Stunden bei – 5 °C bzw. 40 °C und jeweils 2 Stunden für den Temperaturwechsel.

### 3.2.18 Viskosimetrie

Die liposomale Dispersion (arzneistofffrei bzw. arzneistoffhaltig) wurde mit einem Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde 52510/I (Schott AG, D-Hofheim) untersucht. Die Kapillarkonstante betrug  $k = 0,009615$ . Die Proben wurden 10 min bei 20 °C vortemperiert, und dann bei dieser Temperatur vermessen. Aus der gemessenen Zeit wurde die kinematische Viskosität berechnet, die dann durch Multiplikation mit der Dichte in die dynamische Viskosität umgerechnet wurde. Jede Probe wurde fünfmal vermessen und der Mittelwert aus diesen Messungen weiter verwendet. Die Dichten der Proben wurden als Mittelwert aus drei Dichtemessungen bestimmt.

### 3.2.19 Langmuir-Blodgett Filmmessungen



Die Messungen erfolgten mit dem Zweikompartimenttrog Nima 611MC (Nima Technology Ltd, GB-Coventry), mit einer Fläche von 300 cm<sup>2</sup>. Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte mittels eines Drucksensors Nima PS4 (Nima Technology Ltd, GB-Coventry) nach der Vertikalplattenmethode nach Wilhelmy.

Das Lecithin (ca. 0,5 mg/ml) wurde in hochreinem Chloroform (Fisher Scientific, GB-Loughborough) gelöst und auf eine Subphase aus hochreinem Wasser ( $\sim 17,5 \cdot 10^6 \Omega \text{ cm}$  bei 20 °C), hergestellt mit dem System Barnstead Nanopure III (Barnstead International, USA-Dubuque), gespreitet. Alternativ zum hoch reinen Wasser kamen als Subphasen 0,5 % Lokalanästhetika-Lösung zum Einsatz, die mit der gleichen Wasserqualität hergestellt worden waren. Es wurde 15 min gewartet, damit das Lösungsmittel verdunsten konnte. Dann erfolgte die Aufnahme der Isotherme, wobei sich die Barriere mit einer Geschwindigkeit von 10 cm/min bewegte.

---

## 4. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Bevor ternäre Mischungen aus Lokalanästhetikum, Lecithin und Wasser untersucht wurden, wurden zunächst binäre wässrige Systeme im Hinblick auf ihr mesomorphes Potential charakterisiert.

Bei Raumtemperatur liegt das Phospholipon<sup>®</sup> 90 G im flüssigkristallinen Zustand vor [131]. Setzt man Wasser zu, so bildet sich bei etwa 6,8 % Wassergehalt eine lamellare Phase, die bis zu einem Wassergehalt von 40 % einphasig bleibt. Übersteigt der Wassergehalt 40 %, reicht die Lipidmenge nicht mehr aus, um eine zusammenhängende Lamellarphase zu bilden. Es kommt zur Bildung lamellarer Vesikel (Liposomen). Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [132].

Weder Lidocain-HCl noch Prilocain-HCl bilden in wässriger Lösung polarisationsmikroskopisch erkennbare, anisotrope Strukturen.

Mischungen der Propofol-Emulsionen wurden entweder mit den Fertigarzneimitteln Xylonest<sup>®</sup> bzw. Xylocain<sup>®</sup>, den Lösungen des jeweiligen Lokalanästhetikums oder einer Dispersion, in der das Lokalanästhetikum in Liposomen verkapselt vorlag, hergestellt.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse vorgestellt, die unter Verwendung der Fertigarzneimittel erhalten wurden.

### 4.1 Ergebnisse mit den Handelsprodukten

Kaufke und Krauel [12] beschrieben Interaktionen, die sich bei Zumischung kommerzieller Lokalanästhetika-Lösungen zu verschiedenen Propofol-O/W-Emulsionen ergaben (die kommerziell erhältlichen Propofolinjektionszubereitungen sind Emulsionen aus 100 mg/ml Sojabohnenöl, 2,5 mg/ml Glycerol, 12 mg/ml Lecithin und Natriumhydroxid (um den pH-Wert auszugleichen)). Mit Hilfe eines Mastersizers wurde die Größe der emulgierten Fetttropfchen vermessen und deren Größenzunahme nach Zugabe der Lokalanästhetika-Lösung verfolgt. In einigen Fällen kam es zur Bildung kritischer Tropfendurchmesser, beschleunigter Aufrahmung der koaleszierten Tropfen bis hin zur Fettabsccheidung und damit zu einer Zerstörung der Emulsion.

In einer späteren Seminararbeit mit anderen Emulsions-Chargen konnten die Ergebnisse von Kaufke und Krauel nicht reproduziert werden.



Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedener Parameter wie Material der Spritzen, Emulsions-Charge, Temperatur- und Volumeneffekte untersucht.

Um den Einfluss des Spritzenmaterials abzuklären, wurden Mischungen der Propofol-Emulsion Propofol 1 % Fresenius mit Xylonest® bzw. Xylocain® einerseits in Glasspritzen und andererseits in Kunststoffspritzen (BBraun Injekt, B.Braun Melsungen AG, D-Melsungen) desselben Volumens für den Zeitraum von acht Stunden gelagert. Die Mittelwerte und die Verteilungen der Tröpfchengrößen zeigten, dass in den aus den beiden Spritzenmaterialien entnommenen Proben keine kritischen Tropfendurchmesser erreicht wurden (Tabelle 4.1). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten ebenfalls keine auffälligen Unterschiede. Auch in einem späteren Versuchsansatz konnten weder bei bis zu 8-stündiger Lagerung im Glasgefäß noch in Plastikspritzen Öltropfen kritischer Größe, festgestellt werden (Abb. 4.1).

Für die folgenden Untersuchungen wurden daher die Mischungen in Kunststoffspritzen gelagert.

Spritzen- material	Zusatz von Xylocain®	Zusatz von Xylonest®	Blindwert
Kunststoff	Teilchengröße [µm] D 50 %: 0,48 D 90 %: 0,69 Max.: 1,16	Teilchengröße [µm] D 50 %: 0,51 D 90 %: 0,72 Max.: 1,16	Teilchengröße [µm] D 50 %: 0,47 D 90 %: 0,68 Max.: 1,16
Glas	Teilchengröße [µm] D 50 %: 0,48 D 90 %: 0,70 Max.: 1,16	Teilchengröße [µm] D 50 %: 0,26 D 90 %: 0,43 Max.: 0,83	Teilchengröße [µm] D 50 %: 0,26 D 90 %: 0,43 Max.: 1,29

Tabelle 4.1: Tröpfchengrößen der Propofol-Emulsion Propofol 1 % Fresenius und deren Mischung mit Xylocain® bzw. Xylonest® in verschiedenen Spritzen mit 20 ml Volumen. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 8 Stunden.

D 50 %: 50 % der Tropfengrößen liegen unterhalb dieses Wertes

D 90 %: 90 % der Tropfengrößen liegen unterhalb dieses Wertes

Max.: Tropfengröße des größten Tropfens nach 8 h Lagerzeit

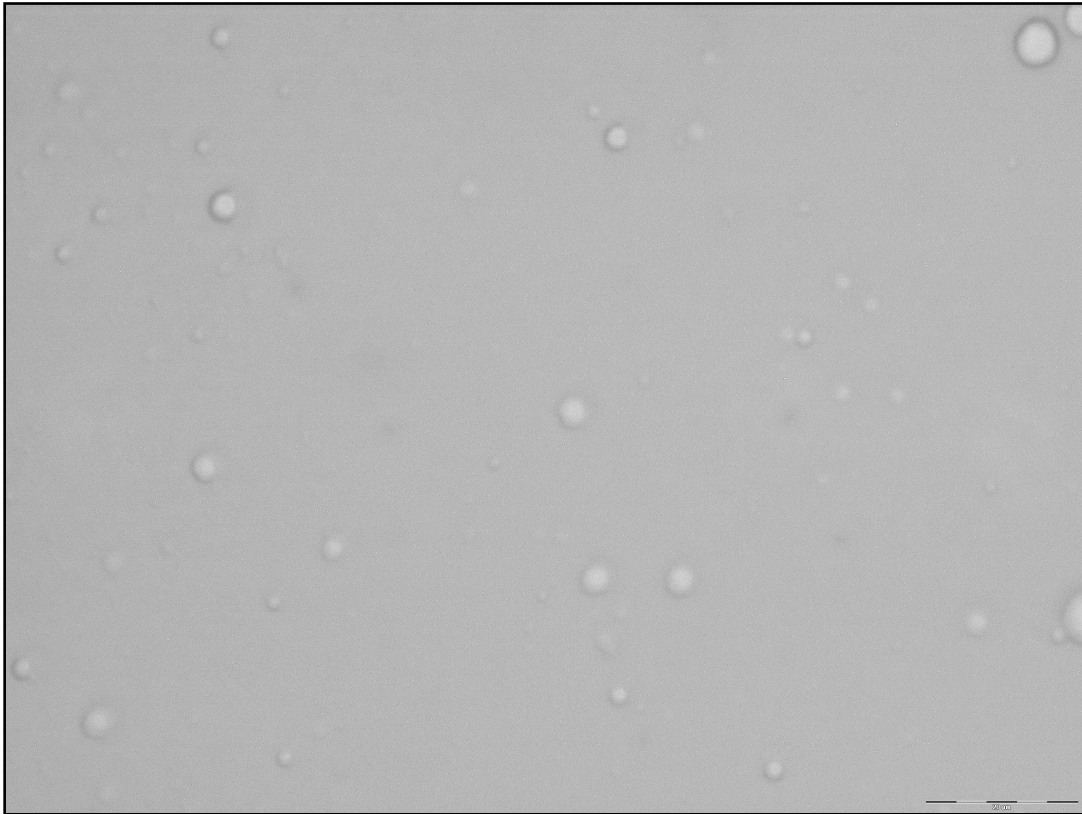
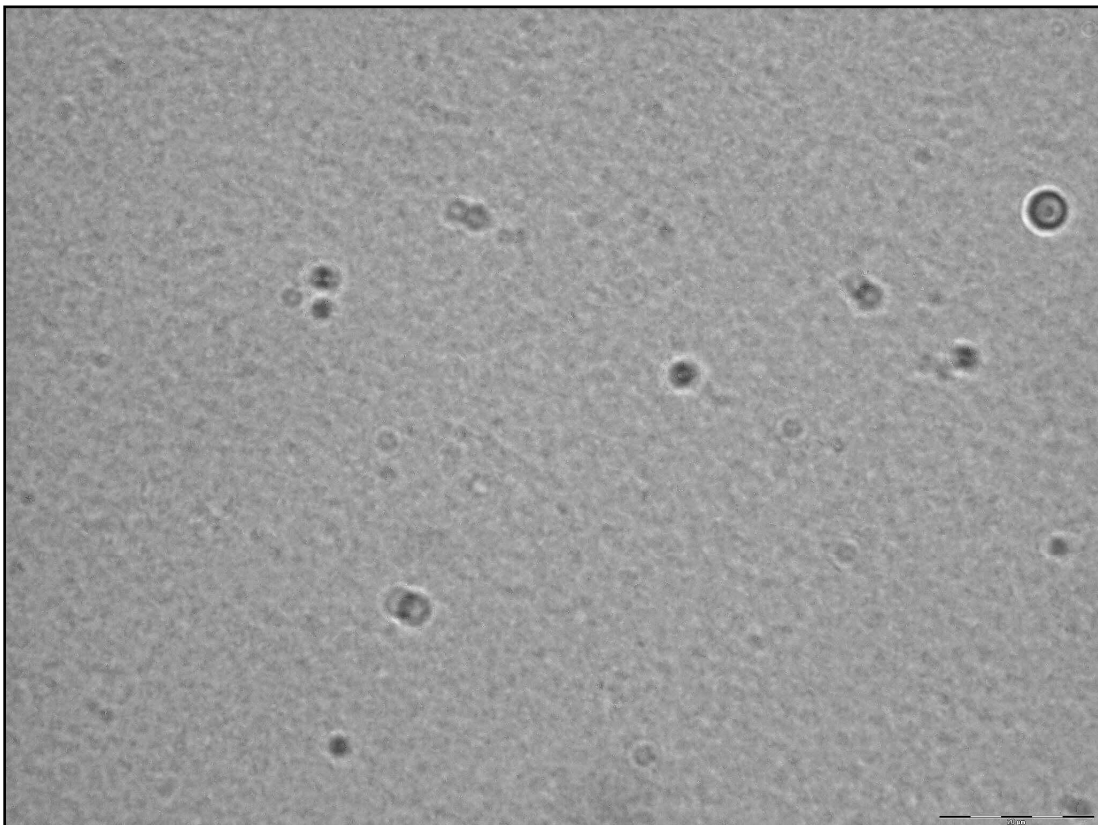


Abbildung 4.1 Vergleich von Mischungen von Prilocain-HCl und Propofol-Emulsion (Propofol 1 % Fresenius), sodass eine Endkonzentration von 0,05 % Prilocain-HCl resultierte. Die Herstellung erfolgte bei 37 °C. Die Messung erfolgte nach 8-stündiger Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur in Glas (oben) oder Kunststoff (unten). Der Balken entspricht 20 µm



Propofol-Emulsion	Charge I	Charge II
Propofol Abbott® 1 %	49-943-27	57-909-27
Disoprivan® 1 %	A 90365 A	A 90792 A
Propofol 1 % Fresenius	KE 156	LF 168 W

Tabelle 4.2: Chargennummern der verwendeten Propofolzubereitungen

Der Einfluss der Charge auf das Ergebnis wurde untersucht, indem zwei Chargen (bzw. bei Propofol Parke-Davis® und Klimofol® je eine) derselben Propofolzubereitung mit denselben Mengen an Xylonest® bzw. Xylocain® versetzt wurden. Von Propofol Parke-Davis® und Klimofol® lag jeweils nur eine Charge vor, sodass ein Vergleich mit einer zweiten Charge entfiel. Die Bezeichnungen der Chargen sind Tab. 4.2 zu entnehmen.

Zur Untersuchung wurden die Kunstoffspritzen nach dem Mischen bei einer Temperatur von 40 °C im Wasserbad gehalten. Zum schnelleren Wärmeausgleich wurde das Wasser mit Hilfe eines Magnetrührers bewegt.

Das in der Gebrauchsinformation [127] empfohlene Verhältnis von 1 %iger Lokalanästhetika-Lösung zu Propofol-Emulsion ist 1:20. Es wurden die Verhältnisse von 1:25 und 1:12,5 untersucht, um eine Probe oberhalb des in der Gebrauchsinformation der Emulsionshersteller empfohlenen Verhältnisses und eine Probe unterhalb des empfohlenen Verhältnisses zu untersuchen.

Die Mittelwerte und die Verteilungen der Tröpfchengrößen waren in den Proben der beiden Chargen vergleichbar mit den Resultaten in Tabelle 4.1. Auch die mikroskopischen Aufnahmen zeigten keine auffälligen Unterschiede.

Um den Einfluss der Temperatur eingehender zu untersuchen, wurden Mischungen mit den Propofol-Emulsionen der Charge I (Tab. 4.2) im Klimaraum bei einer Raumtemperatur von 20 °C hergestellt und gelagert, sowie weitere Proben bei einer Raumtemperatur von 24,5 °C hergestellt und dann in einem 40 °C warmen Wasserbad gelagert. Für die Raumtemperaturlagerung wurden Mischungen in den folgenden Verdünnungen hergestellt, 1:20, 1:13.34 und 1:8; für die 40 °C-Lagerung 1:20, 1:13.34, 1:10 und 1:6.67 (Verhältnis Xylocain® zu Propofol-Emulsion). Über einen Zeitraum von 6 Stunden wurden alle zwei Stunden Proben entnommen und unmittelbar danach im Mastersizer vermessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Theorie nach Mie.

Die Proben, die bei 20 °C hergestellt und gelagert wurden, zeigten alle auch am Ende der Versuchszeit von 6 Stunden keine Zeichen einer Teilchengrößenzunahme (Abb. 4.2). Während die Proben, die bei 24,5 °C hergestellt und dann bei 40 °C gelagert wurden, deutliche Zeichen einer Teilchengrößenzunahme zeigten.

Proben, die Xylocain® im Verhältnis 1:20 enthielten, zeigten diese Teilchengrößenzunahme, die geringe ausfiel (Abbildung. 4.3) erst nach 6 Stunden 23 Minuten, die während Proben mit größerem Zusatz von Xylocain® im Verhältnis 1:40 bei der ersten Messung (nach 2,1 Stunden) eine deutliche Teilchengrößenzunahme zeigten. (Abbildung 4.4).

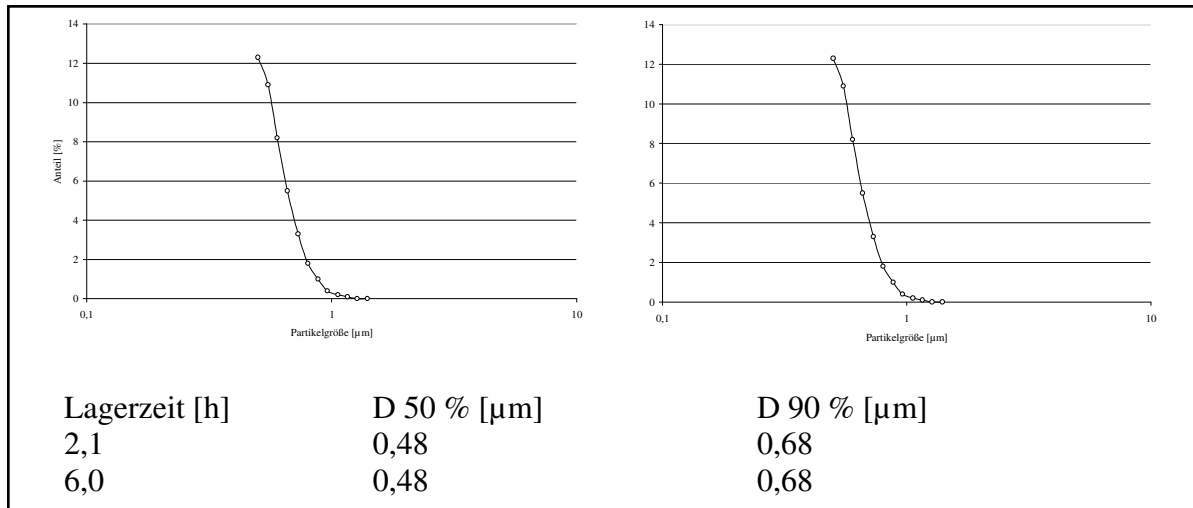


Abbildung 4.2 Partikelgrößenverteilung einer Mischung von Propofol 1 % Fresenius und Xylocain® im Verhältnis 26,68:1 bei einer Temperatur von 20 °C und einer Lagerzeit von 2,1 h (links) und 6,0 h (rechts)

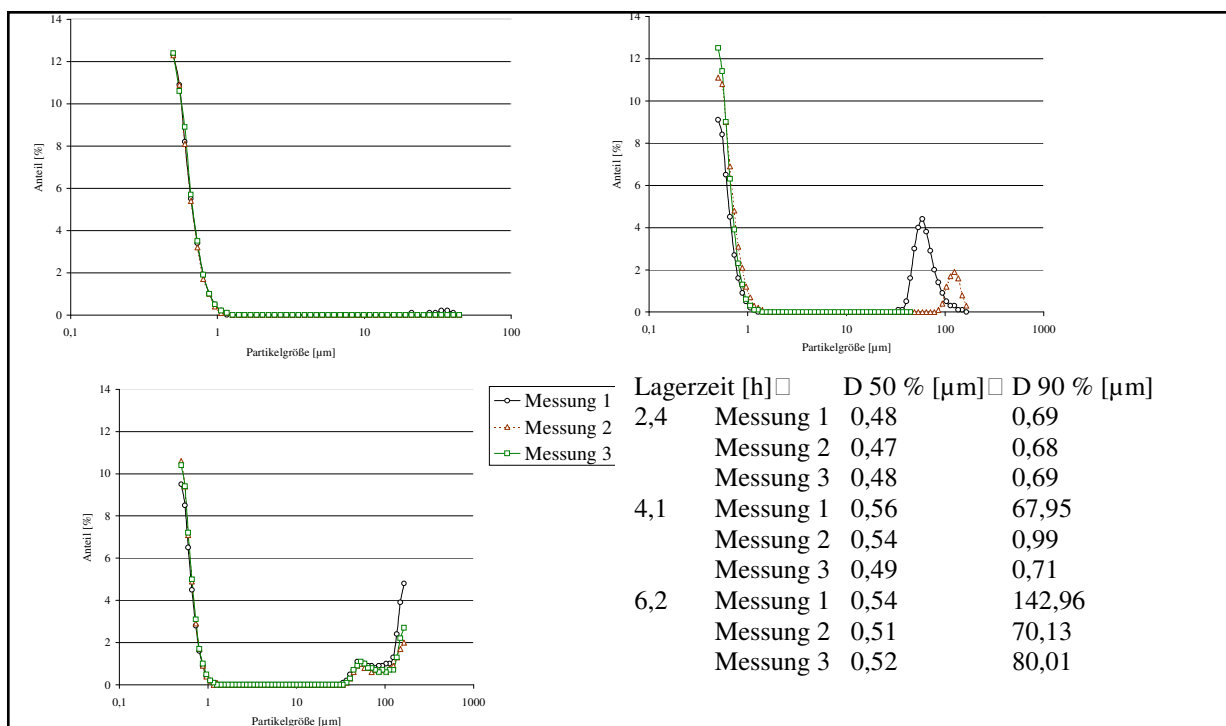


Abbildung 4.3 Partikelgrößenverteilung einer Mischung von Propofol 1 % Fresenius und Xylocain® im Verhältnis 20:1 bei einer Temperatur von 40 °C und einer Lagerzeit von 2,4 h (oben links), 4,1 h (oben rechts) und 6,2 h (unten links)

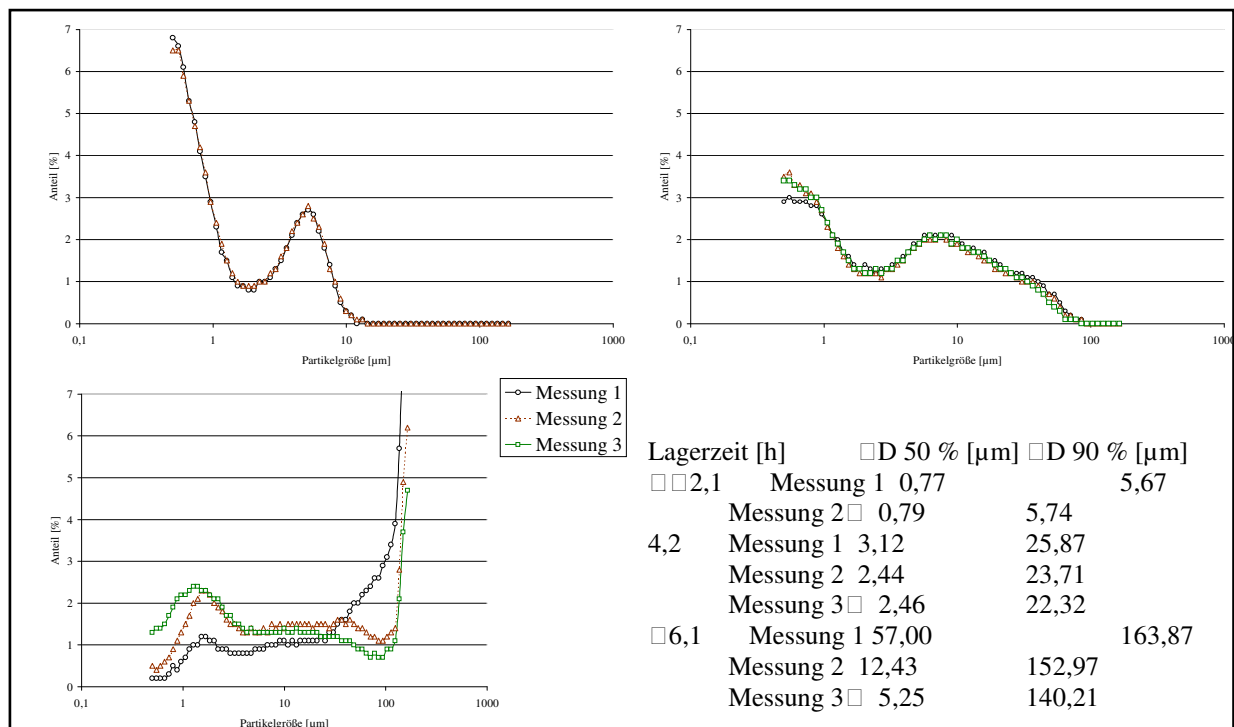


Abbildung 4.4 Partikelgrößenverteilung einer Mischung von Propofol 1 % Fresenius und Xylocain® im Verhältnis 40:1 bei einer Temperatur von 40 °C und einer Lagerzeit von 2,1 h (oben links), 4,2 h (oben rechts) und 6,1 h (unten links)

Um zu klären, ob eine Interaktion mit dem Propofol oder mit dem Emulgator vorliegt, wurde die Propofol-O/W-Emulsion durch Lipofundin® MCT 20 % (Braun Melsungen AG, D-Melsungen) ersetzt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine O/W-Emulsion mit derselben Konzentration an Lecithin wie bei der Propofol-Emulsion.

Auch die Lipofundin®-Emulsion wurde mit Xylocain® versetzt und im Mastersizer vermessen. Xylocain® wurde der Fettemulsion in einem Verhältnis von 1:50, 1:33,33, 1:25, 1:16,66 und 1:10 zugesetzt. Nur bei dem Verhältnis 1:5 war eine Teilchengrößenzunahme nachweisbar. Auch bei einer Lagerzeit von über 19 Stunden bei Raumtemperatur konnte bei den übrigen Proben, deren Anteil an Xylocain® weniger als 2,83 % betrug, keine Teilchengrößenzunahme festgestellt werden (Abbildung 4.5).

Als Vergleich wurde die Emulsion ohne Zusatz von Xylocain® vermessen. Die Messung lieferte dieselben Ergebnisse, wie die Vermessung einer unverdünnten Propofol-O/W-Emulsion. Die Proben wurden im 40 °C warmen Wasserbad gelagert und über einen Zeitraum von acht Stunden in zweistündigem Abstand vermessen. Auch bei der Abschlussmessung nach etwa 19,5 Stunden, konnte keine Teilchengrößenzunahme festgestellt werden (siehe Abbildung 4.5).

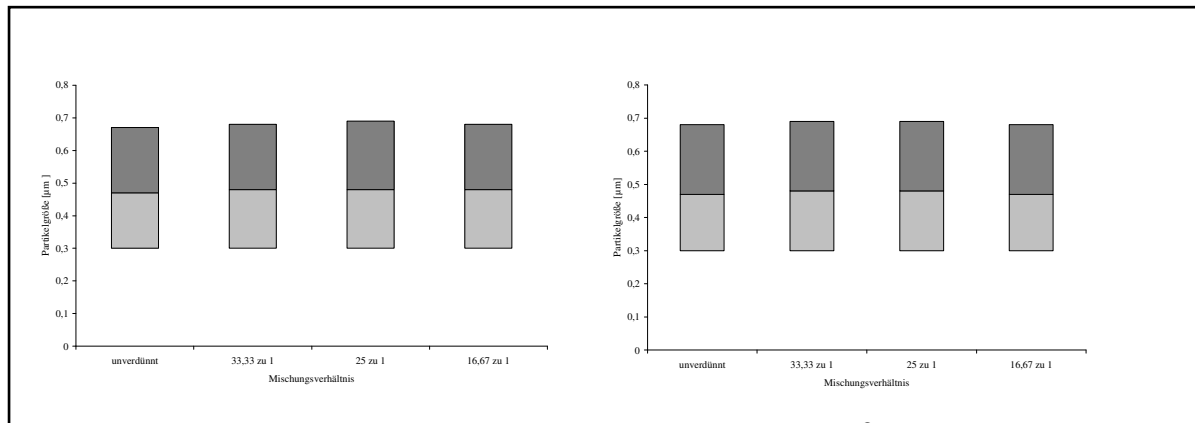


Abbildung 4.5 Partikelgrößenverteilung von Mischungen Lipofundin® MCT 20 % und 1 %iger Lidocain-HCl-Lösung nach 2 h (links) und zum Abschluss (rechts). Die Lagerung erfolgte bei 40 °C.

Um zu zeigen, ob Lidocain-HCl mit dem Emulgator interagiert oder nicht, wenn es überdosiert wird, wurde Xylocain® in einem Verhältnis von 1:10 zu Propofol 1 % Fresenius zugesetzt. Zum Vergleich wurde reine Propofol-Emulsion des gleichen Herstellers sowie eine Mischung mit Xylonest® im Verhältnis von 1:10 angesetzt. Die Proben wurden bei 40 °C im Wasserbad gelagert und nach 4 Stunden vermessen.

Die Probe Xylocain® zu Propofol 1 % Fresenius im Verhältnis von 1:10 zeigte als einzige der drei Proben Zeichen einer Teilchengrößenzunahme.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Ergebnissen von Lilley et al. [133], die bei Zusatz von einer 1%igen Lidocain-HCl zu Propofol-Emulsionen im Verhältnis  $\geq 1:10$  eine Destabilisierung der Propofol-Emulsion festgestellt hatten.

Der Einfluss der Lecithinkonzentration wurde untersucht, indem in den Proben der Anteil an Phospholipid erhöht wurde. Dazu wurden 5 ml Proben bestehend aus, entweder unverdünnter Propofol-Emulsion (Propofol 1 % Fresenius) oder deren Mischung mit Xylocain® im Verhältnis von Propofol-Emulsion zu Xylocain® von 50:1, 31,25:1, 25:1 und 15,625:1 vermessen. Diesen Proben wurde eine 3 % (m/m) lecithinhaltige Liposomdispersion zugesetzt. Das Volumen der zugesetzten Liposomdispersion betrug das 2,5fache des Volumens der eingesetzten Xylocain®-Lösung. Die resultierende Konzentration an Propofol, Lidocain-HCl und Phospholipon® 90G kann aus Tabelle 4.3 entnommen werden.

Eine Teilchengrößenzunahme war erst bei dem Verhältnis Propofol-Emulsion zu Xylocain® von 15,625:1 erkennbar (Abbildung 4.6 und 4.7).

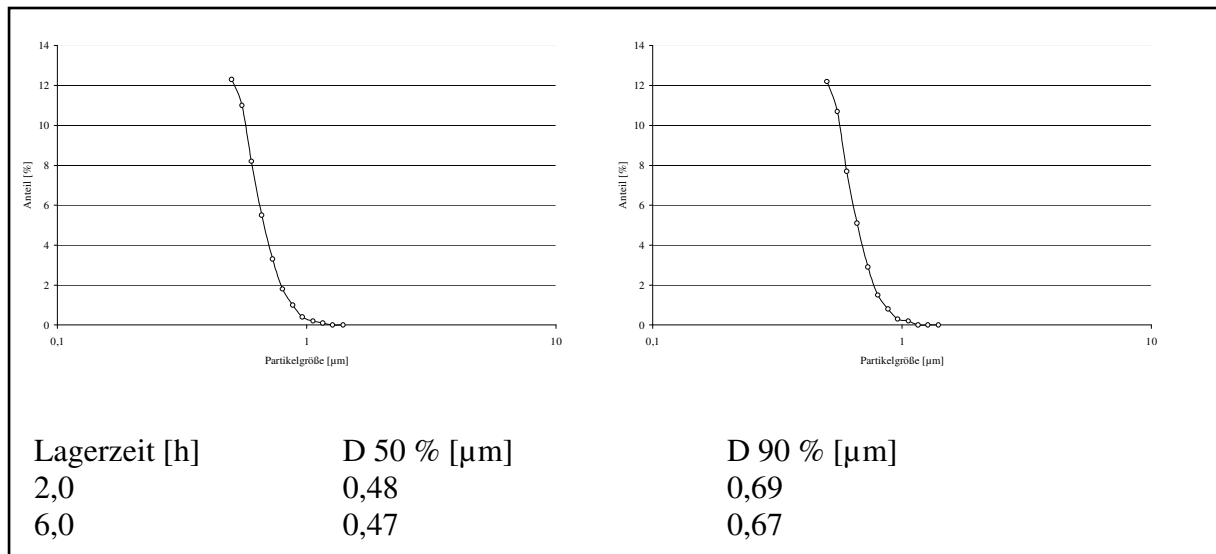


Abbildung 4.6 Partikelgrößenverteilung einer Mischung von Propofol 1 % Fresenius und 1 %iger Lidocain-HCl-Lösung im Verhältnis 50:1 und einem Zusatz von 0,115 % liposomalen Phospholipon® 90 G nach einer Lagerzeit von 2,0 h (links) und 6,0 h (rechts) bei 40 °C

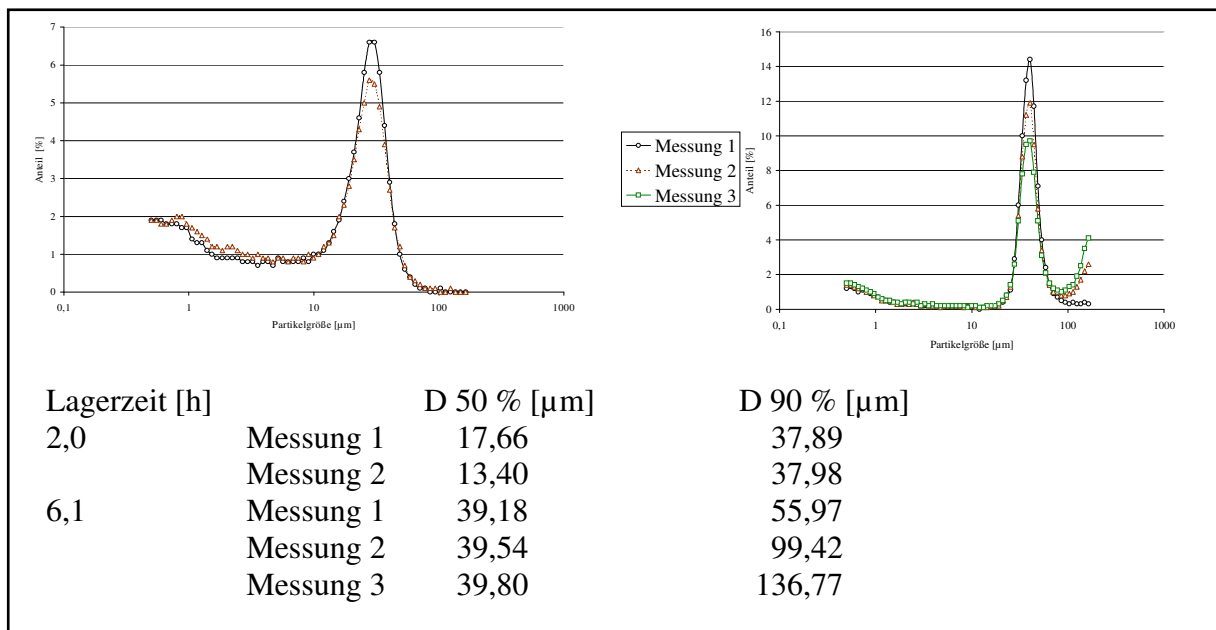


Abbildung 4.7 Partikelgrößenverteilung einer Mischung von Propofol 1 % Fresenius und Xylocain® im Verhältnis 15,625:1 und einem Zusatz von 0,18 % liposomalen Phospholipon® 90 G nach einer Lagerzeit von 2,0 h (links) und 6,1 h (rechts) bei 40 °C

Verhältnisse von Propofol-Emulsion zu Xylocain® (verdünnt 1:1)	Lidocain-HCl Konzentration [%]	Propofol Konzentration [%]	Phospho- lipon 90 G Zusatz [%]
50:1	0,0187	0,935	0,0467
31,25:1	0,0288	0,899	0,0719
25:1	0,0351	0,877	0,0877
15,625:1	0,0523	0,817	0,1307

Tabelle 4.3 Anteil Propofol, Lidocain-HCl und Phospholipon® 90G bei verschiedenen Verhältnissen

## Zusammenfassung:

Die von Kaufke und Krauel beobachtete Wechselwirkung zwischen Xylonest® und der Propofol-Emulsion [12] konnte nicht reproduziert werden.

Auch die Veränderung der Herstellungs- bzw. Lagerbedingungen, z.B. die Temperatur der Herstellung bzw. Lagerung, das Material der Lagergefäße, die Verwendung von Propofolzubereitungen unterschiedlicher Chargen, führte zu keiner Veränderung des Verhaltens von Xylonest® gegenüber Xylocain®.

Obwohl in den Abbildungen ab 4.2 nur Mischungen von Propofol-Emulsion mit Xylocain® gezeigt wurden, waren die Untersuchungsergebnisse mit Xylonest® analog, das heißt in diesen Untersuchungen konnte kein Unterschied in der Verwendung von Xylonest® und Xylocain® als Zusatz zu einer Propofol-Emulsion gefunden werden.

Im vorgeschlagenen Verhältnis von 20 T und 1 T einer 1 % Lokalanästhetika-Lösung, trat auch beim Wechsel von Xylocain® zu Xylonest® keine Inkompatibilität auf.

## 4.2 Charakterisierung der Lokalanästhetika

Kaufke und Krauel beobachteten bei Zusatz von Prilocain-HCl zu einer Propofol-Emulsion eine Inkompatibilität [12], die bei der Verwendung von Lidocain-HCl nicht auftrat. Die beiden Lokalanästhetika zeigen außer in der Löslichkeit (Tabelle 4.4) und dem Verteilungsquotienten in vielen Parametern ein analoges Verhalten (Tabelle 4.5).

Daher wurde untersucht, ob auch andere physikochemische Eigenschaften, welche die Löslichkeit beeinflussen, bei den beiden Lokalanästhetika voneinander abweichen.



	Wasser	Alkohol	Chloroform	Ether
Lidocain-HCl	1 : 0,7	1 : 1,5	Löslich	Prakt. unlöslich
Prilocain-HCl	1 : 3,5	1 : 4,2	1 : 175	Prakt. unlöslich

Tabelle 4.4 Löslichkeit von Lidocain-HCl [134] und Prilocain-HCl [135]

	Lidocain (-HCl)	Prilocain (-HCl)
pK <sub>a</sub> -Wert	7,9	7,9
Wirkung	Schnell einsetzend Mittellang wirksam	Schnell einsetzend Mittellang wirksam
Metabolisierung	hoher First-pass-Effekt	hoher First-pass-Effekt
Verteilungskoeffizient	2,9	0,9

Tabelle 4.5 Vergleich der Eigenschaften von Lidocain-HCl und Prilocain-HCl (nach [136])

Auffällig ist, dass Lidocain-HCl besser wasserlöslich als Prilocain-HCl ist und einen höheren Verteilungskoeffizienten aufweist.

#### 4.2.1. Messung der Oberflächenspannung

Da die Benetzbarkeit eines Feststoffes die spätere Auflösung mitbeeinflusst, sollte untersucht werden, ob die beiden Lokalanästhetika-Lösungen nach Zusatz zu einer Propofol-Emulsion die Oberflächenspannung beeinflussen. Dazu wurde eine 1 %-ige Lösung des Lokalanästhetikums im in der Gebrauchsinformation genannten Verhältnis von 20:1 (Propofol-Emulsion : Lokalanästhetika-Lösung 1 %) [127] zugesetzt. Als Propofol-Emulsion diente hier Propofol 1 % Fresenius. Diese Mischung wurde mit einem Interfacialtensiometer, ausgestattet mit einem Platin-Iridium-Ring, beruhend auf der Theorie von Lecomte du Noüy vermessen. Die Temperatur der vermessenen Zubereitung war  $20 \pm 0.3$  °C.

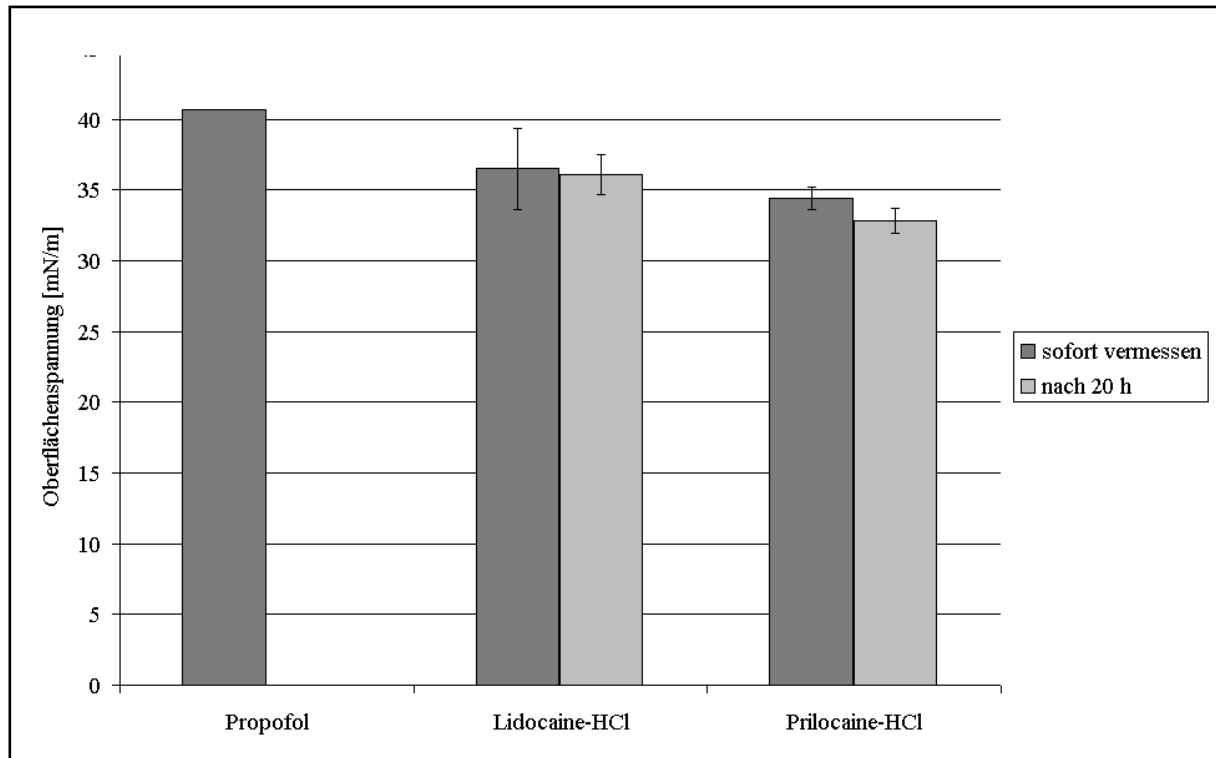


Abbildung 4.8 Oberflächenspannung von Propofol 1 % Fresenius ohne und mit Zusatz von Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl (n=3)

Die Oberflächenspannung der Propofol-Emulsion von 40,69 mN/m wurde durch den Zusatz von Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl auf Werte von 36,51 mN/m  $\pm$  2,84 mN/m bzw. 34,39 mN/m  $\pm$  0,78 mN/m reduziert. Diese Abnahme der Oberflächenspannung zeigte sich bereits bei der ersten Messung. Die weitere Verminderung nach 20 Stunden Lagerung war gering (Lidocain-HCl (36,10 mN/m  $\pm$  1,39 mN/m) bzw. Prilocain-HCl (32,85 mN/m  $\pm$  0,88 N/m) (Abbildung 4.8)).

Da die beiden Lokalanästhetika-Lösungen eine Veränderung der Oberflächenspannung bewirkten, sollte, wie bei oberflächenaktiven Substanzen üblich, die oberflächenaktive Wirkung in Abhängigkeit der Konzentration bestimmt werden. Hierzu sollte die Konzentration detektiert werden, bei der die Oberflächenspannung trotz weiterer Zugabe der oberflächenaktiven Substanzen kaum mehr abfällt.

Ein Teil der oberflächenaktiven Substanzen zeichnet sich dadurch aus, dass sich in Abhängigkeit von der Konzentration Mizellen bilden, deren Anzahl ebenfalls konzentrationsabhängig ist. So sind bei einer geringen Konzentration nur wenige Mizellen vorhanden, während mit zunehmender Konzentration die Zahl an Mizellen überproportional ansteigt.

Die Kritische Mizellbildungskonzentration (KMK), die Konzentration, bei der Mizellbildung nachgewiesen werden kann, kann indirekt über Oberflächenspannungsmessungen ermittelt werden. Da aus thermodynamischer Sicht eine Anreicherung der oberflächenaktiven Moleküle an der Oberfläche günstiger ist als eine Mizellbildung, hat im Bereich der KMK die Oberflächenbelegung einen relativ hohen Sättigungsgrad erreicht. Daraus folgt, dass die Oberflächenspannung mit zunehmender Konzentration der oberflächenaktiven Moleküle bis zum Erreichen der KMK relativ stark absinkt, um bei einer weiteren Zunahme der Konzentration ein Plateau zu erreichen.

Die Oberflächenspannung der Lokalanästhetika-Lösung wurde mit einem Interfacial-Tensiometer bei einer Messtemperatur von  $20 \pm 0.3$  °C bestimmt. Unterschiedliche Lokalanästhetikakonzentrationen wurden durch Wasserzugabe zu konzentrierten Lokalanästhetika-Lösungen der beiden Wirkstoffe Lidocain-HCl und Prilocain-HCl erreicht. Nach der Wasserzugabe wurde eine Minute gerührt und dem System vor der Messung fünf Minuten Ausgleichszeit gegeben.

Die Auswertung erfolgte, indem je eine Ausgleichsgerade durch den Anfangsbereich der Kurve, in dem die Oberflächenspannung bei Konzentrationserhöhung der oberflächenaktiven Substanz sinkt, und dem Endbereich der Kurve, in dem auch eine weitere Zugabe der oberflächenaktiven Substanz nicht mehr zu einer Reduktion der Oberflächenspannung führt, gelegt und deren Schnittpunkt ermittelt wurde. Dieser Schnittpunkt ergab sich bei einer Konzentration an Lidocain-HCl von 14,87 % (m/m) (Abbildung 4.9).

Da für diese Methode ein hoher Materialeinsatz vonnöten war -so musste jeweils etwa 20 ml der Lösung eingesetzt werden- sollte die weniger Materialaufwand erfordernde Stalagmometer-Methode genutzt werden. Hierbei nutzt man die direkte Proportionalität zwischen der Oberflächenspannung und dem Volumen der an der Abtropfstelle entstehenden Tröpfchen einer Flüssigkeit (Gleichung 3.2 (Seite 51)).

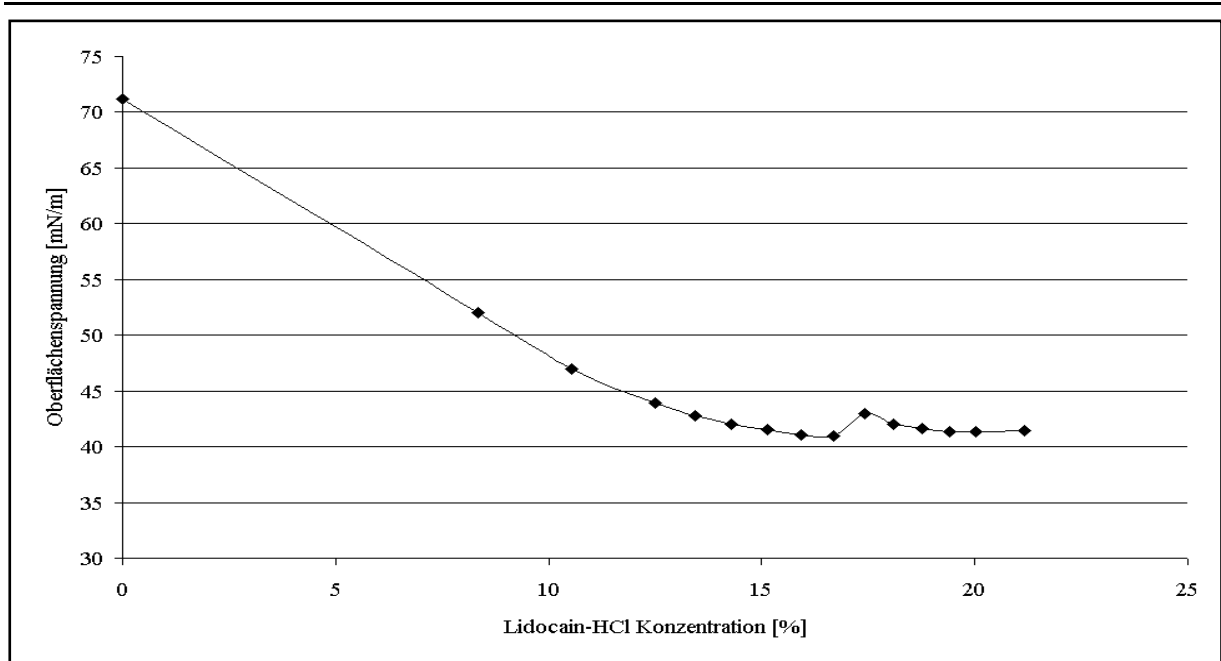


Abbildung 4.9 Oberflächenspannung von Lidocain-HCl bestimmt mit einem Ring-Tensiometer

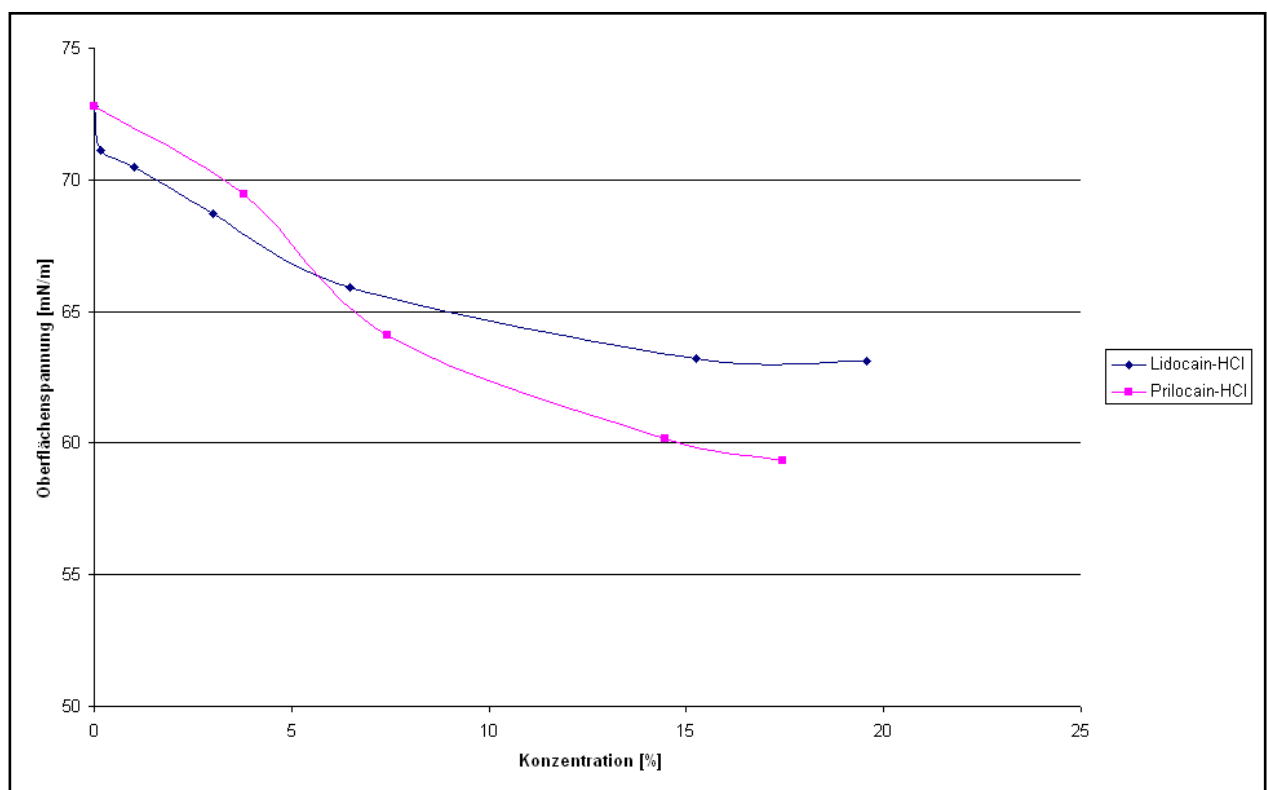


Abbildung 4.10 Oberflächenspannung einer 1 %-Lösung von Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl ermittelt nach der Stalagmometer-Methode

Die Auswertung liefert hier einen Wert bei 8,64 % (m/m) für Lidocain-HCl und 10,03 % (m/m) für Prilocain-HCl (Abbildung 4.10).

Die Verwendung des Stalagmometers reduzierte zwar die benötigte Menge an Lokalanästhetika-Lösung, lieferte aber keine zuverlässigen Ergebnisse, da diese Methode sehr fehleranfällig ist. So führt eine geringe Temperaturschwankung zu einem verfälschten Messergebnis. Zudem kann das Volumen des letzten Tropfens nur ungenau abgeschätzt werden.

#### 4.2.2 Untersuchung auf Assoziatbildung

Zum direkten Nachweis gebildeter Mizellen nutzt man ihre Fähigkeit wasserschwerlösliche Substanzen solubilisieren zu können. Zur besseren Visualisierung setzt man als wasser-unlösliche Substanz häufig den lipophilen Azofarbstoff Sudanrot B ein, der nach Solubilisierung in Mizellen die Lösung intensiv rot färbt. Die spektralphotometrisch gemessene Absorption von Sudanrot B nimmt gemäß Abbildung 4.11 erst oberhalb einer Lidocain-HCl Konzentration  $> 20 \text{ \% (m/m)}$  zu.

Die beobachtete Zunahme der Absorption muss nicht zwangsläufig ein Hinweis auf eine Mizellbildung sein. Die hohe Konzentration an Lidocain-HCl, bei der Absorption merkbar zunimmt, deutet eher auf eine Lösungsvermittlung durch Ausbildung eines  $\pi$ -Donor- $\pi$ -Akzeptor-Komplexes zwischen dem aromatischen Ringsystems des Farbstoffes und dem des Lokalanästhetikums hin [129].

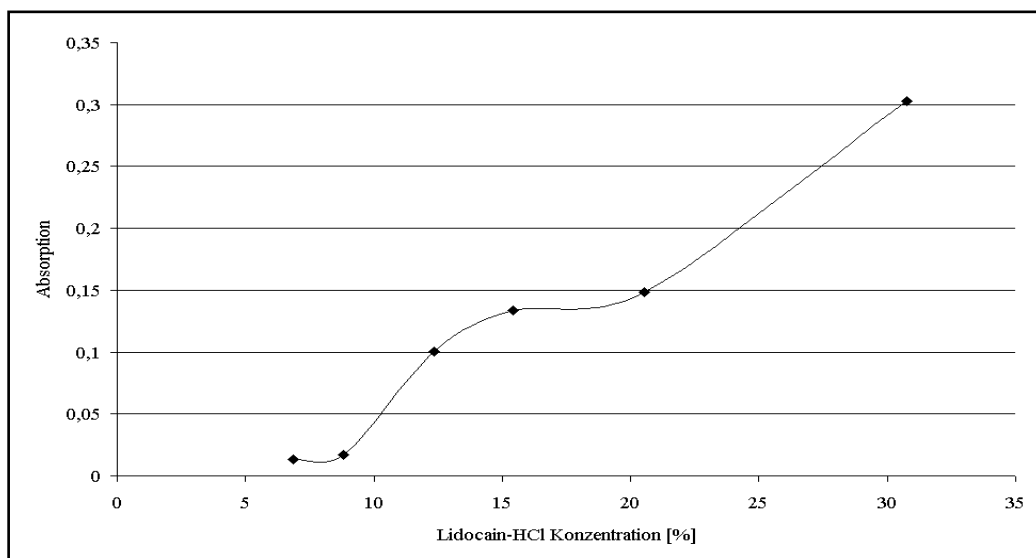


Abbildung 4.11 Absorption von Sudanrot B bei  $\lambda=510 \text{ nm}$  in Lidocain-HCl Lösungen verschiedener Konzentrationen

Daher wurde zur Untersuchung auf Assoziatbildung alternativ die Methode nach Zhang et al. benutzt [130]. Danach soll die Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffs DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien) bei Erreichen der KMK abrupt ansteigen, wenn der wasser-unlösliche Fluoreszenzfarbstoff im hydrophoben Innenraum der gebildeten Mizellen solubiliert wird.

Wie Abbildung 4.12 zu entnehmen ist, steigt die Fluoreszenzintensität auch nach Erhöhung der Konzentration an Lokalanästhetikum nicht deutlich an.

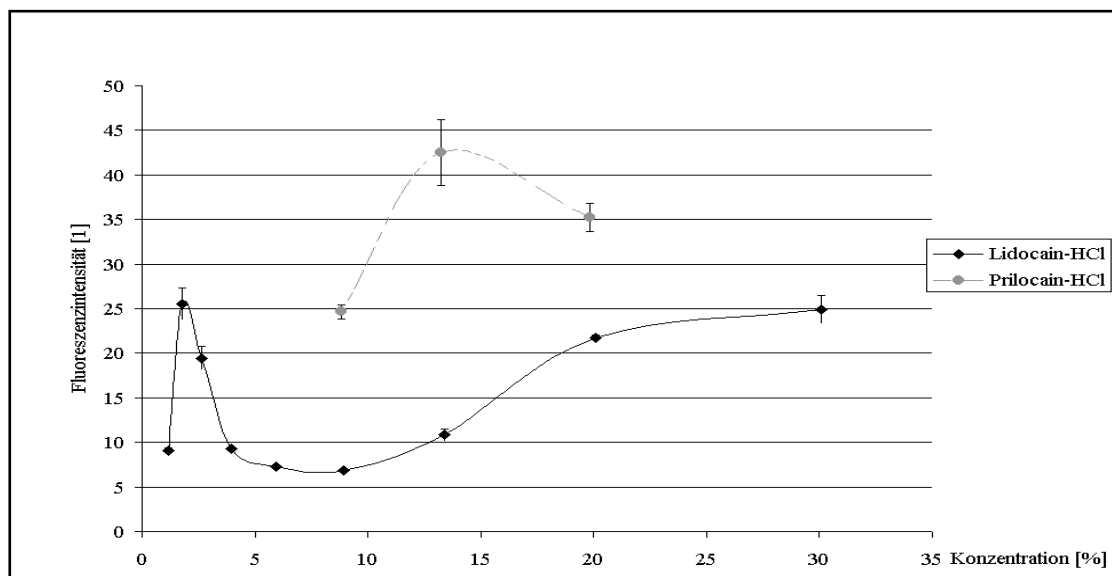


Abbildung 4.12 Fluoreszenzintensität abhängig von der Konzentration von Lidocain-HCl und Prilocain-HCl

Bei anderen oberflächenaktiven Substanzen ist schon bei niedrigeren Konzentrationen ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität feststellbar (z.B. Triton X-100 0,28 mM; Natriumdodecylsulfat 8 mM; Natriumcholat 16,2 mM bei 25 °C [130]). Es ist also davon auszugehen, dass weder Lidocain-HCl noch Prilocain-HCl im gemessenen Konzentrationsbereich Assoziate bilden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Schlussfolgerungen von Attwood und Fletcher, die ebenfalls Untersuchungen zum Selbst-Assoziationsverhalten von Lokalanästhetika in wässriger Lösung durchgeführt haben [137].

---

## **4.3 Herstellung und Charakterisierung von Liposomendispersionen**

### **4.3.1 Wahl der Herstellungsmethode**

Bei der Herstellung von Liposomendispersionen ist man in der Größe der Liposomen und in der Auswahl der Dispersionsmedien beschränkt, wenn eine intravenöse Applikation angestrebt wird. Es wurden daher SUVs ausgewählt, die aufgrund ihrer geringen Größe auch bei Aggregation nicht zu einer Embolie führen würden. Von den verschiedenen Methoden, nach denen SUVs hergestellt werden können (Kapitel 2.4), wurde die Behandlung mit Ultraschall gewählt, weil diese Methode auf die Verwendung von organischen Lösemitteln verzichtet. Der in Kapitel 2 angesprochene mögliche Eintrag von Metallionen kann durch den Zusatz des Komplexbildners EDTA neutralisiert werden. Ein EDTA-Zusatz ist sogar vorteilhaft, da Studien erwiesen haben, dass der Zusatz von EDTA zur Propofol-Emulsion keine negative Wirkung, z.B. auf den Elektrolythaushalt hat, sondern im Gegenteil sogar zu einer Verminderung der Sterblichkeit unter der Propofolanästhesie führt [138, 139].

Nachdem in Voruntersuchungen festgestellt wurde, dass die indirekte Energieübertragung eines Ultraschallbades nicht zur Dispergierung ausreicht, erfolgte der Ultraschalleintrag direkt mit Hilfe eines Soniprep<sup>®</sup> 150 MSE Ultraschall Disintegrator.

### **4.3.2 Wahl der Lecithinmenge**

In einem ersten Schritt sollte die Lecithinkonzentration gewählt werden, die zu einem möglichst kleinen z-average und einer möglichst engen Verteilung der Liposomendispersionen führt. Daneben beeinflussen auch die eingebrachte Energie und die Dauer des Energieeintrags das Ergebnis des Dispergierens.

Das beste Ergebnis in Bezug auf kleine Teilchengröße und enge Teilchengrößenverteilung wurde mit einer Lecithinkonzentration von 3 % erhalten.

Bei einer hohen Konzentration an Lecithin wurde unter den gewählten Herstellungsbedingungen keine enge Größenverteilung erreicht, obwohl die Teilchengröße hinreichend klein war.

Bei einer Konzentration unter 2 % Lecithin waren die Liposomen noch zu groß und der Polydispersitätsindex erreichte Werte bis zu 0,4, was einer sehr breiten Verteilung entspricht, und daraus folgend die Liposomgröße sehr unterschiedlich ist (Abbildung 4.13).

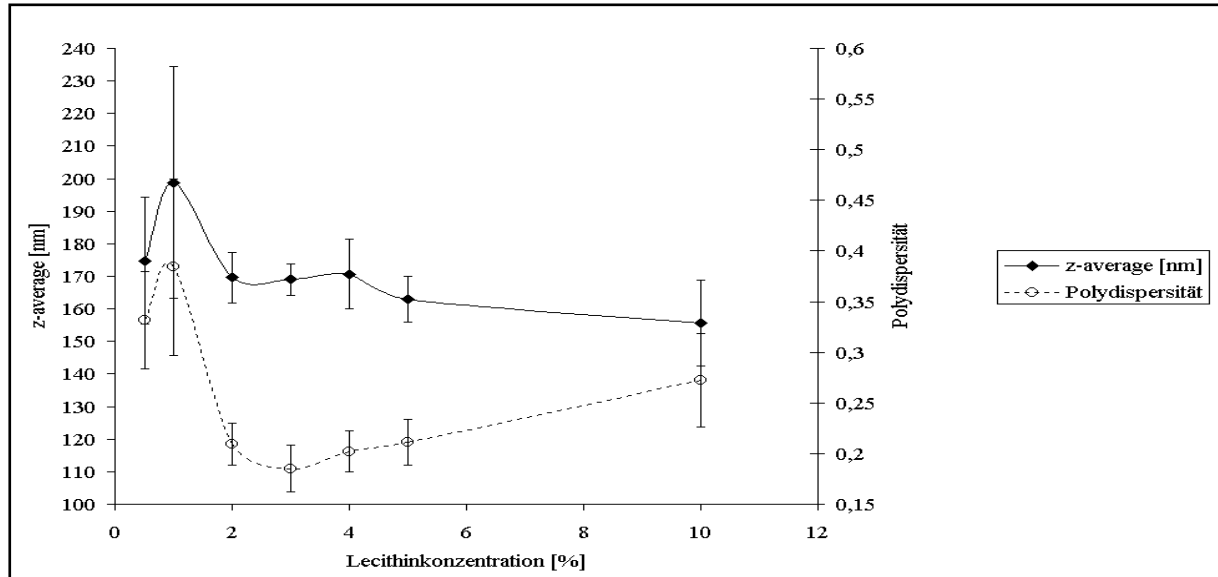


Abbildung 4.13 Polydispersität und z-average, abhängig von der Lecithinkonzentration. Die Herstellung erfolgte diskontinuierlich (jeweils 60 s Energieeintrag und 60 s Pause in 15 Zyklen) unter Eiskühlung. (n=3)

### 4.3.3 Variation der Herstellungsbedingungen

Bei der Beschallung zeigte sich, dass auch der Energieeintrag ein Optimum besitzt, bei dem die Liposomen eine enge Größenverteilung zeigen. Zwar nimmt die Teilchengröße mit dem Energieeintrag ab, jedoch führt ein höherer Energieeintrag zu einer Zunahme der Verteilungsbreite (Abbildung 4.14). Eine Beschallung mit fünfzehn Zyklen, jeweils 60 s Energieeintrag und 60 s Pause erwies sich als beste Variante. 20 Zyklen lieferten keine Verbesserung mehr, vielmehr nahmen die Standardabweichungen von Teilchengrößen und Teilchengrößenverteilung zu, weshalb im Weiteren die Herstellung mit 15 Beschallungszyklen eingesetzt wurde.



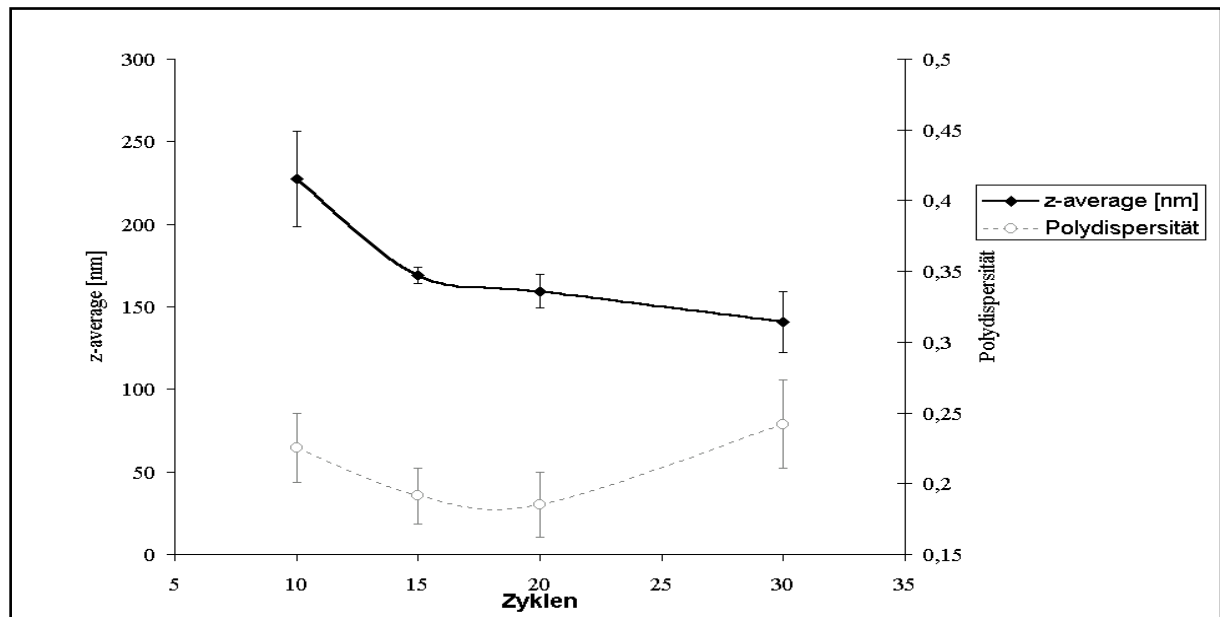


Abbildung 4.14 Polydispersität und z-average, abhängig von der Zyklenzahl (jeweils 60 s Energieeintrag und 60 s Pause) unter Eiskühlung. Die Lecithinkonzentration betrug 3 %. (n=3)

Ebenfalls wichtig scheint der Wechsel von Beschallung und Pause zu sein. So lieferte die Beschallung in Zyklen (je Zyklus 60 Sekunden Energieeintrag und 60 Sekunden Ruhephase) eine engere Verteilung der Partikelgrößen, während der Eintrag derselben Energiemenge durch eine kontinuierliche Beschallung zu einer größeren Polydispersität führte (Abbildung 4.15).

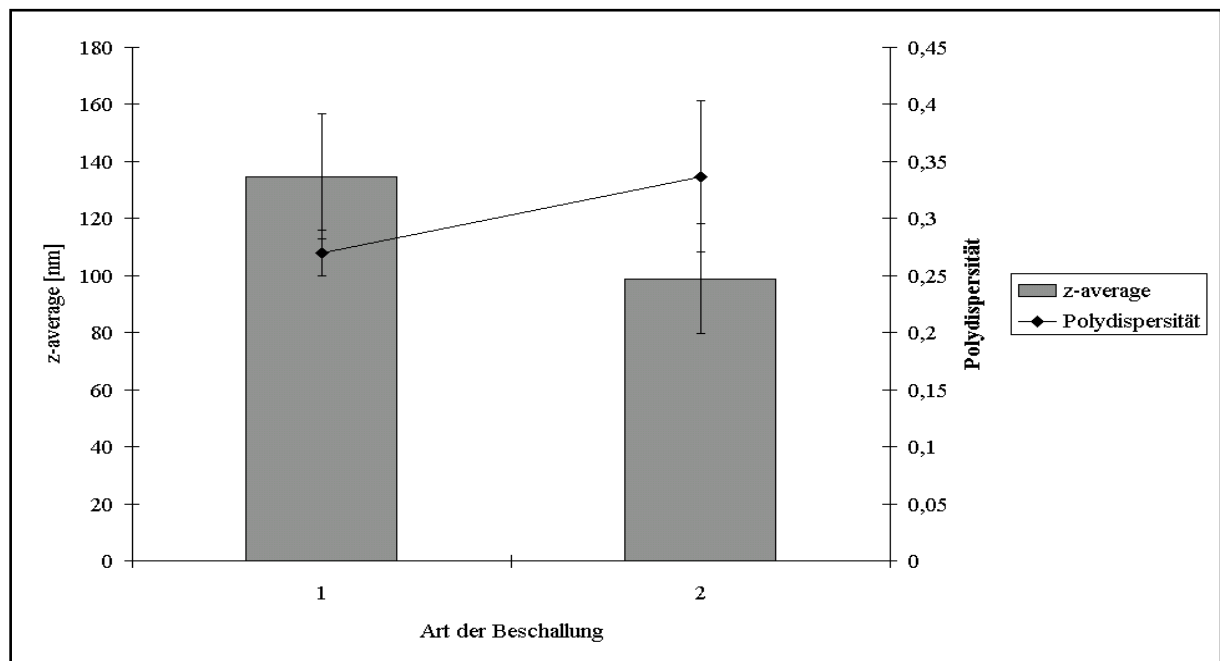


Abbildung 4.15 Abhängigkeit von z-average und Polydispersität von der Art der Beschallung. Die gleiche Energie wurde diskontinuierlich (15-maliges Beschallen über je 60 s mit jeweils 60 s Pause  $\hat{=}$  15 Zyklen) (1) bzw. kontinuierlich über 900 s (2) eingebracht. (n=3)

Da eine Bildung von Liposomen nur oberhalb der Übergangstemperatur möglich ist (Kap. 2.4), resultieren die kleineren Liposomen mit einer engeren Verteilung der Liposomengrößen bei einem diskontinuierlichem Energieeintrag wahrscheinlich aus einer längeren Verweilzeit der Proben bei höherer Temperatur. Dieses wurde untersucht, indem ein Temperaturprofil während der Beschallung aufgenommen wurde.

Die Probe wurde unter Eiskühlung 15 Minuten kontinuierlich bzw. in 15 Perioden (jeweils 60 s Energieeintrag und 60 s Ruhephase) beschallt, wobei alle 30 Sekunden die Temperatur der Probe gemessen wurde (Abbildung 4.16).

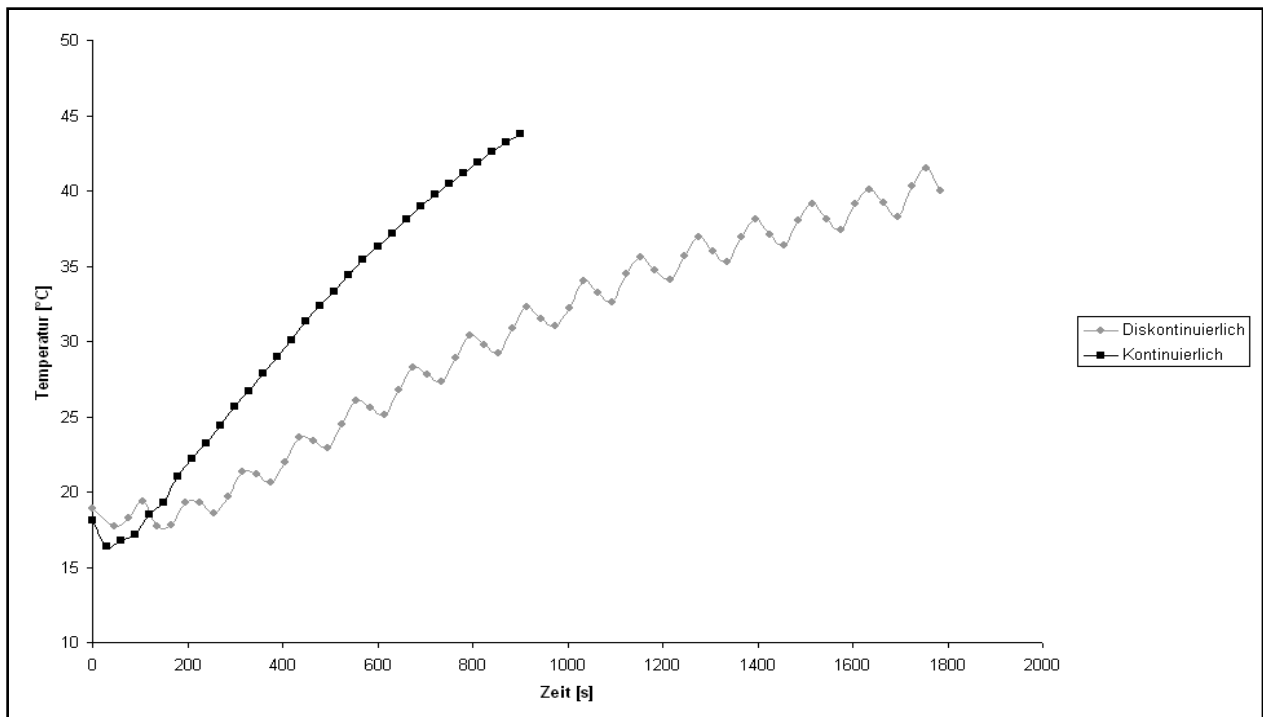


Abbildung 4.16: Darstellung der Temperatur in Abhängigkeit von der Zeit bei der Beschallung mit Ultraschall für kontinuierliche und diskontinuierliche Beschallung unter Eiskühlung (10 g H<sub>2</sub>O und 5 g Eis)

Während der Behandlung mit Ultraschall muss die Probe gekühlt werden. Hierzu wird eine Mischung aus Eis und Wasser verwendet. Die Variation der Masse an Eis und Wasser hat Einfluss auf den erreichbaren z-average und die Polydispersität der Größenverteilung. Die Masse an Wasser und Eis kann aus Tabelle 4.6 entnommen werden. Die Masse der Probe betrug 5 g.

Um bei einem ausreichend kleinen z-average eine Probe mit einer möglichst geringen Größenverteilung zu erhalten, wurde als Zusammensetzung der Kühllösung 10 g Wasser und 5 g Eis gewählt (Tabelle 4.6).

z-average (nm) Polydispersitätsindex	Masse Wasser (g)	Masse Eis (g)
209,15 0,4855	0	10
187,03 0,3440	2,5	10
183,00 0,315	5	10
161,70 0,3170	10	2,5
167,93 0,2843	10	5
181,90 0,2800	10	10
231,53 0,3527	10	20

Tabelle 4.6 Partikelgröße und Polydispersitätsindex, bei diskontinuierlicher Beschallung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Kühllösung (n=1)

Im ersten Schritt war somit das Verhältnis Wasser/Eis normiert. Zu einer weiteren Standardisierung der Eiskühlung müssen nun verschiedene weitere Parameter berücksichtigt werden: Die Ausgangstemperatur des Wassers, die Ausgangstemperatur und die relative Oberfläche des Eises sowie die Zeitspanne von der Mischung des Eises mit dem Wasser bis zum Messbeginn, da ein Teil des Eises während der Beschallung schmilzt.

Um unabhängig von diesen verschiedenen Parametern im Zusammenhang mit wechselnden Eistemperaturen und –oberflächen zu werden, wurde ein Beschallungsschema ermittelt, bei dem sich die Probe ohne Gebrauch einer Eiskühlung möglichst lange im Temperaturbereich zwischen 27 °C und 50 °C aufhält.

Dieser Temperaturbereich stimmt mit dem Umwandlungsbereich des Lecithins überein, dessen Überschreiten eine Voraussetzung für die Bildung von Liposomen ist. Bei hochreinen Fettsäureresten in Lecithinmolekülen ist eine Übergangstemperatur exakt anzugeben. Da Lecithin aber ein Gemisch von Phosphatidylcholinen ist, die sich in der Fettsäurezusammensetzung unterscheiden, findet man keine scharfe Umwandlungstemperatur, sondern einen breiten Umwandlungsbereich (ca. 27 °C – 50 °C [101]).

Es war daher das Ziel, einen Beschallungsplan zu finden, der es ermöglicht, möglichst lange in dem Temperaturbereich zwischen 27 °C und 50 °C zu bleiben, um möglichst kleine Partikelgrößen und niedrige Polydispersität zu erzielen.

Das beste Ergebnis lieferte eine Beschallung der Probe in Zyklen von 30 s Energieeintrag und 80 s Ruhephase. Exemplarisch wird das Temperaturprofil dieser Probe gezeigt (Abbildung 4.17).

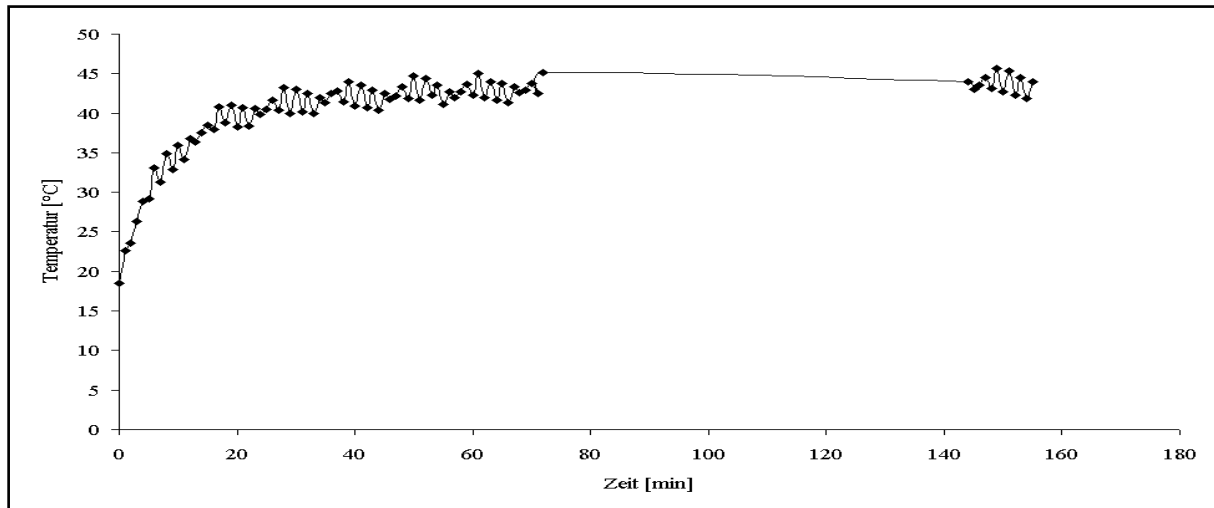


Abbildung 4.17 Temperaturprofil einer Probe, beschallt in Zyklen (je 30 s Energieeintrag und 80 s Ruhephase ohne Eiskühlung)

Bei dem Vergleich der Partikelgrößen und deren Verteilung einer mit und einer ohne Eiskühlung hergestellten Probe ergab sich, dass die ohne Eiskühlung hergestellte Probe sogar kleinere Partikel lieferte als die Probe unter Verwendung der Eiskühlung (Abbildung 4.18). Daher erfolgten die weiteren Herstellungen mit Beschallung in 30 Zyklen (jeweils 30 s Energieeintrag und 80 s Ruhephase) unter Verzicht auf Eiskühlung.

In einer weiteren Untersuchungsserie wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Größe der Liposomen ermittelt. Dazu wurde die wässrige Phase der Probe durch Puffer bzw. Säure ersetzt. Vor der Bestimmung der Partikelgröße wurde der pH-Wert der Probe bestimmt.

Bei einem sauren pH-Wert zeigen die Liposomen eine Zunahme der Partikelgröße, welche schon bei geringer Erniedrigung des pH-Werts auftrat. Eine weitere Verringerung des pH-Werts führt zu keiner weiteren Größenzunahme.

Beispielhaft ist in Abbildung 4.19 die Liposomgröße und die Größenverteilung bei Herstellung in einem sauren pH-Bereich ( $\text{pH}=6,5$ ), verglichen mit der Herstellung im neutralen Bereich ( $\text{pH}=7,0$ ) dargestellt.

Während bei der Herstellung der Probe eine Erniedrigung des pH-Werts eine Größenzunahme bewirkte, führte eine Liposomherstellung im alkalischen Bereich zu einer Polydispersität über 0,5, d.h. zu einer derart breiten Partikelgrößenverteilung, dass keine Auswertung mehr möglich war.

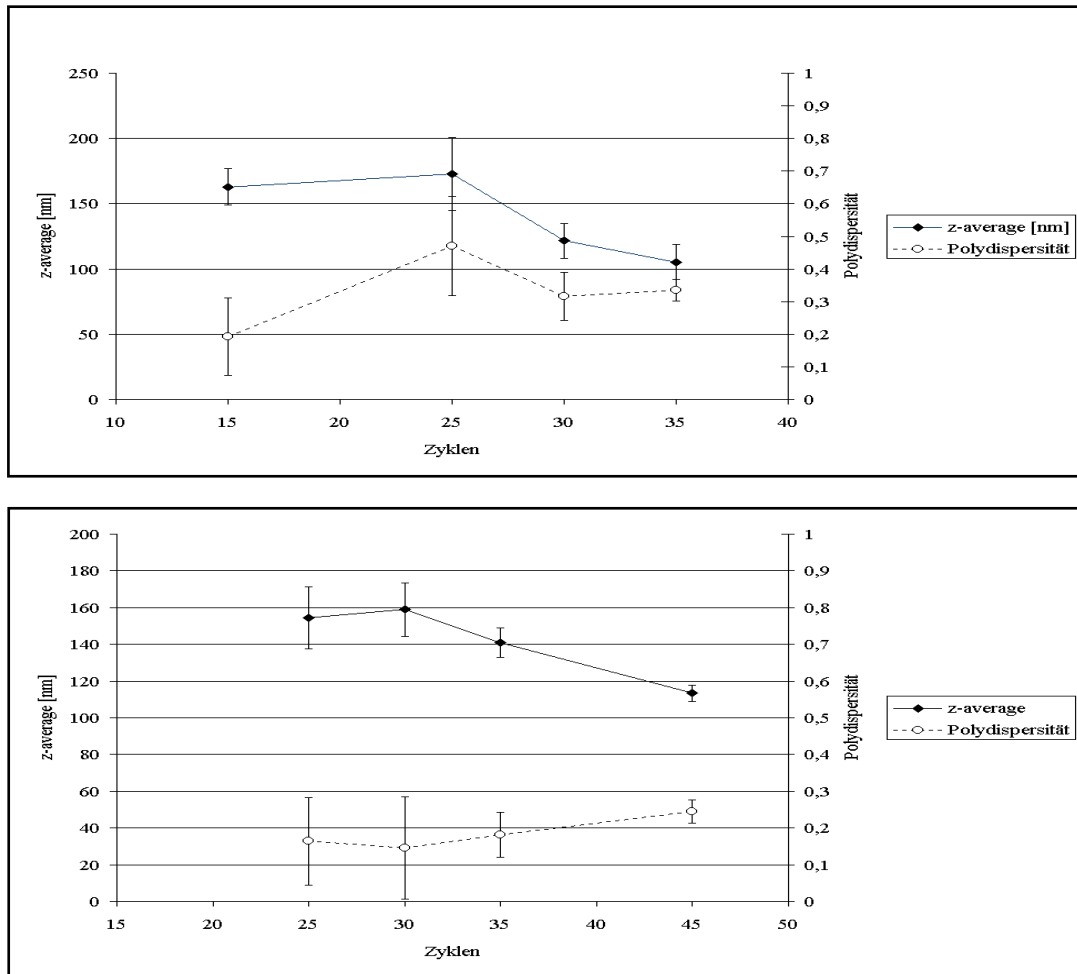


Abbildung 4.18 Abhängigkeit von z-average und Polydispersität bei verschiedener Zyklenanzahl (jeweils 30 s Energieeintrag und 80 s Ruhephase) ohne (oben) oder mit (unten) Eiskühlung. Die Proben enthielten 3 % Lecithin (n=3)

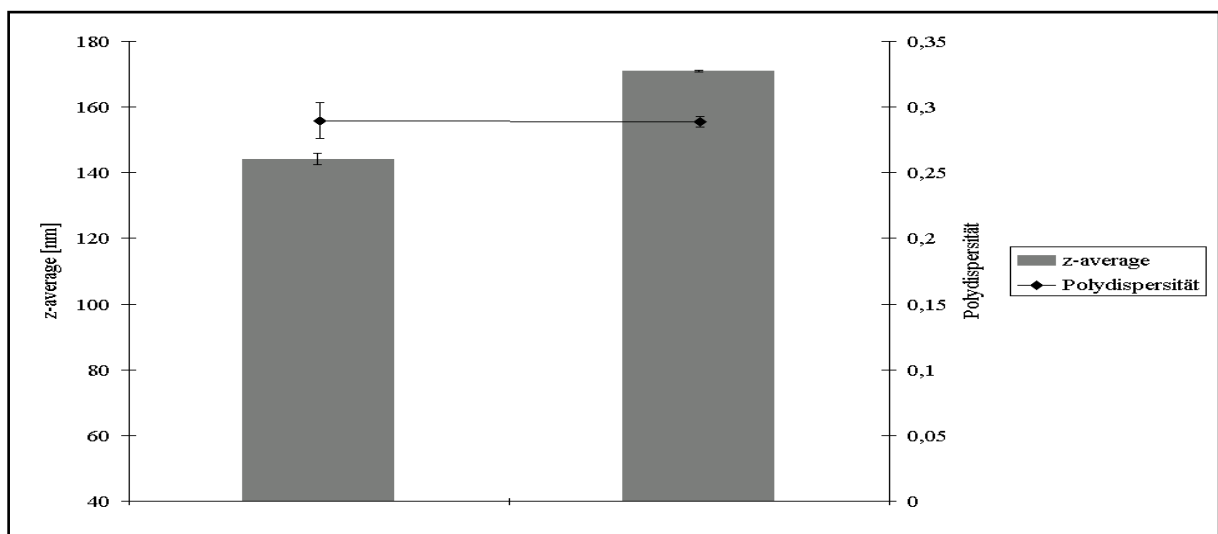


Abbildung 4.19 Polydispersität und z-average abhängig vom pH-Wert bei der Herstellung pH=7,0 (links); pH=6,5 (rechts) (n=3)

Wie in Kapitel 2.4 erwähnt, schließt sich an die eigentliche Herstellung der Liposomendispersionen eine Filtration an, um eine engere Größenverteilung zu erhalten. Der Verlust an Lipid durch das Filtrieren sollte abgeschätzt werden. Dazu wurde eine kolorimetrische Bestimmung der Phospholipide mit Hilfe der Molybdat-Vanadat-Reaktion (Kap. 3.2.4) im Filtrat durchgeführt.

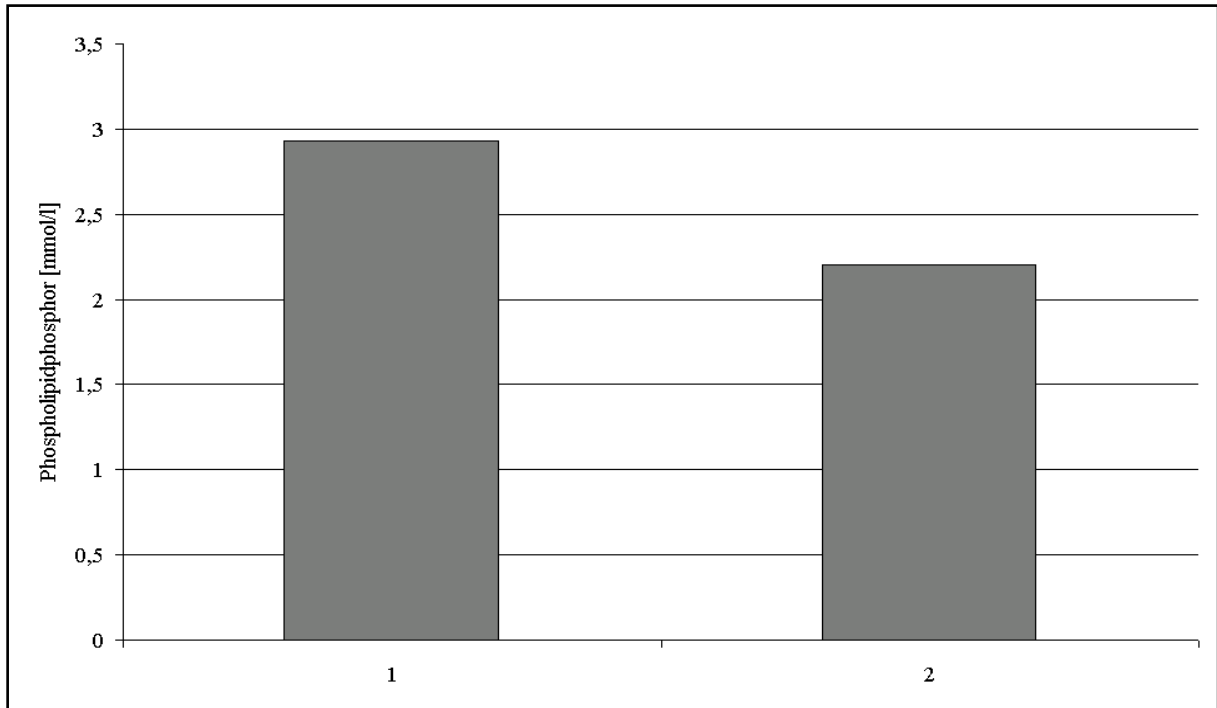


Abbildung 4.20 Phospholipidphosphor vor (1) und nach (2) der Filtration. Die Beschallung der Probe erfolgte in 30 Zyklen (jeweils 30 s Energieeintrag und 80 s Pause)

Aus Abbildung 4.20 ergibt sich, dass durch die Filtration die erfassbare Phosphatkonzentration aus dem Phospholipid von 2,93 mmol/l auf 2,20 mmol/l gesenkt wird. Das Filtrieren führt also zu einem Verlust von 24,9 %.

#### 4.3.4 Beladung der Liposomen

Nachdem die optimalen Bedingungen der Leerliposomherstellung erarbeitet waren, sollten die Leerliposomen nun mit dem Lokalanästhetikum beladen werden. Das Ziel der folgenden Untersuchung war es, die Konzentration an Lokalanästhetikum zu bestimmen, die zu den kleinsten Liposomen und der engsten Größenverteilung führte. Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration wurde Lidocain-HCl verwendet.

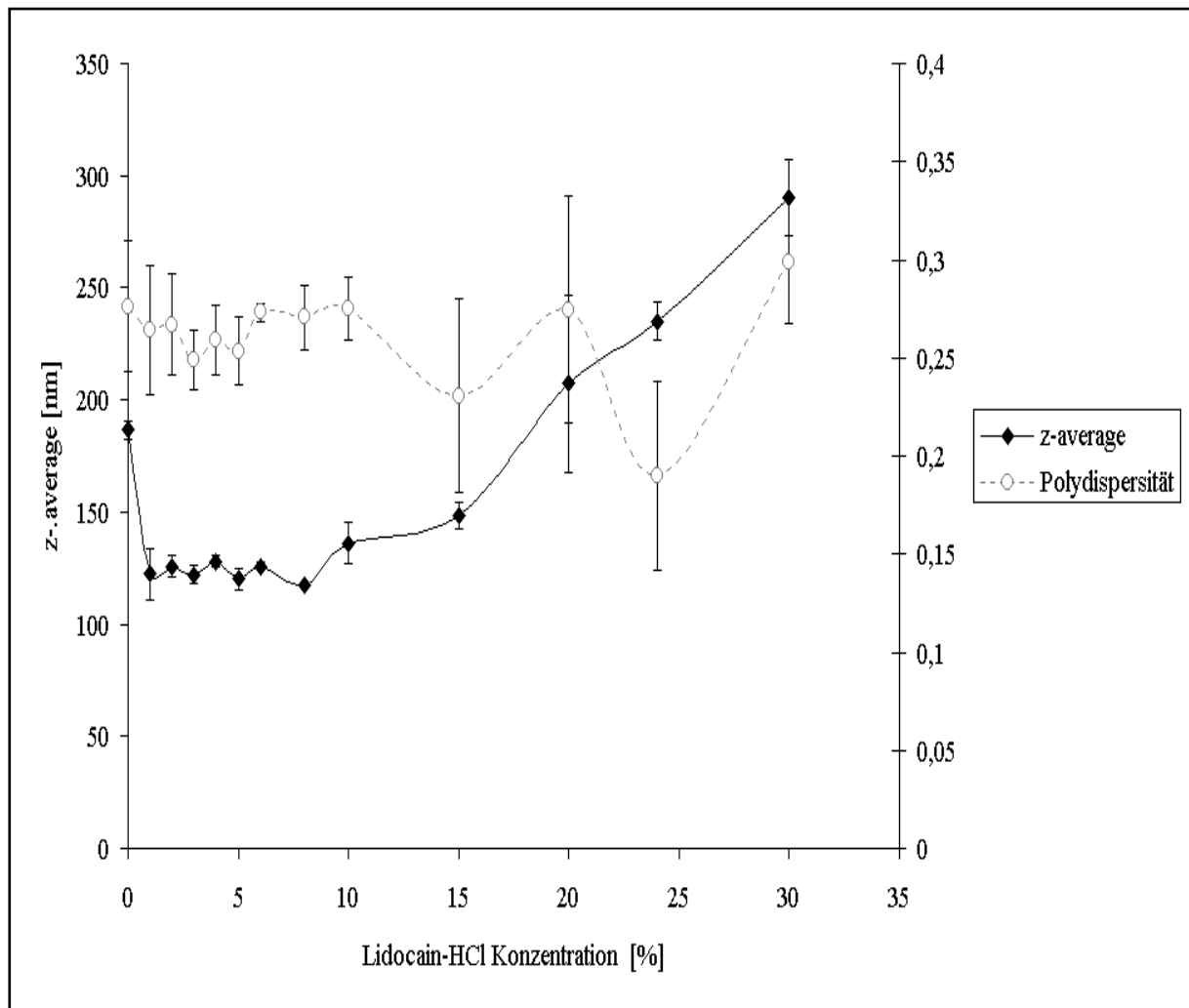


Abbildung 4.21 Polydispersität und z-average der Liposomen abhängig von der zugesetzten Menge an Lidocain-HCl (n=3)

Die Abbildung 4.21 zeigt, dass die Zugabe an Lokalanästhetikum limitiert ist, wenn Liposomen erhalten werden sollen, die sich durch einen kleinen z-average und eine enge Verteilung auszeichnen. Für die weiteren Untersuchungen ist, wenn nicht anders angegeben, eine Konzentration der Lokalanästhetika von 5 % gewählt worden. Die Liposomen unter Zusatz von 8 % Lidocain-HCl weisen zwar einen ähnlich geringen z-average, aber eine tendenziell breitere Verteilung auf, d.h. die Verteilung zeigt eine höhere Polydispersität.

---

### 4.3.5 Lokalisation des Lokalanästhetikums

#### 4.3.5.1 Fluoreszenz Untersuchungen

Nach Beladung der Liposomen mit Lokalanästhetikum war die Frage von Interesse, in welchem Bereich das Lidocain-HCl und das Prilocain-HCl in den Liposomen positioniert sind. Dazu wurden verschiedene Tests durchgeführt:

a) Bestimmung der Arzneistoffbindung im hydrophilen Bereich

Die Bestimmung erfolgte über eine Verdrängung des im hydrophilen Teil des Phospholipids bindenden Fluoreszenzfarbstoffs 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS). Dieser Farbstoff fluoresziert ca. 100 mal stärker, wenn er an Phospholipide gebunden ist, als wenn er frei vorliegt. Es ist jedoch zu beachten, dass ANS auch stärker fluoresziert, wenn es an Lidocain-HCl gebunden ist. Jedoch weist die Fluoreszenz bei einer Bindung an Lidocain-HCl einen Wert auf, der oberhalb desjenigen für Wasser, aber unterhalb desjenigen für das Phospholipid liegt. Die Bindung an Prilocain-HCl führt zu keiner Fluoreszenz.

b) Bestimmung der Arzneistoffbindung im lipophilen Bereich

Die Bestimmung nutzte ebenfalls die Verdrängung eines Fluoreszenzfarbstoffs aus der Bindung am Phospholipid durch das Lokalanästhetikum. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde hier das im lipophilen Bereich der Phospholipide bindende 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) genutzt. Beide Lokalanästhetika bilden mit DPH keine fluoreszierenden Assoziate.

Beide Lokalanästhetika zeigen analoges Verhalten, sie bewirken nämlich keine Verminderung der Fluoreszenzintensität des an die Phospholipide gebundenen DPHs (Abbildung 4.23), während die Fluoreszenzintensität des ANS leicht vermindert wird (Abbildung 4.22). Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Lokalanästhetika eher im polaren Bereich als im hydrophoben Bereich der zu Liposomen assoziierten Phospholipidmoleküle aufhalten. Sie werden demnach nicht in die Phospholipiddoppelschicht eingebaut, sondern sind entweder an der inneren oder äußeren „Oberfläche“ der Liposomen lokalisiert.

Inwieweit kalorimetrische Untersuchungen dieses Ergebnis stützen bzw. weitere Informationen liefern können, sollte mit Hilfe der Dynamischen Differenzkalorimetrie überprüft werden.





Abbildung 4.22 Fluoreszenzintensität abhängig von der resultierenden Lokalanästhetikakonzentration. Die Proben enthielten eine Konzentration an Phospholipid von 1 mmol/l und an ANS von 10  $\mu$ mol/l.

(n=1)



Abbildung 4.23 Fluoreszenzintensität abhängig von der resultierenden Lokalanästhetikakonzentration. Die Proben enthielten eine Konzentration an Phospholipid von 1 mmol/l und an DPH von 11 pmol/l.

(n=1)

### 4.3.5.2 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) von arzneistoffbeladenen Liposomendispersionen

In DSC-Untersuchungen werden Phasenumwandlungen und die damit verbundenen Energiemengen erfasst. Hierbei weist das Ausgangssystem, z.B. eine arzneistofffreie Liposomendispersion, eine bestimmte Umwandlungstemperatur und eine damit verbundene Energiemenge auf. Wird eine weitere Substanz zugemischt, so zeigt die DSC-Untersuchung der Mischung eine Veränderung der Phasenumwandlungstemperatur und/oder der Umwandlungsenergie im Falle einer Wechselwirkung. Bei der Liposomdispersion ist vor allem die Beeinflussung der Schmelztemperatur und Schmelzenthalpie von Wasser als Hauptbestandteil und äußere Phase von Interesse. Daher wurden die Ergebnisse aus DSC-Untersuchungen von arzneistofffreien und arzneistoffhaltigen Liposomendispersionen verglichen.

Sowohl der 5 %-ige Zusatz von Lidocain-HCl als auch von Prilocain-HCl senkt die Onset-Temperatur von  $-0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  für das arzneistofffreie System auf  $-2,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  für die Lidocain-HCl-haltigen bzw. auf  $-2,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  für die Prilocain-HCl-haltigen Liposomen. Die Enthalpie ändert sich von  $366,2\text{ mJ/mg}$  auf  $317,5\text{ mJ/mg}$  bzw.  $312,4\text{ mJ/mg}$  analog mit der Breite und Form der Schmelzpeaks der arzneistoffhaltigen zu den arzneistofffreien Liposomen (Abbildung 4.24). Die Gefrierpunktserniedrigung und die Abnahme der Schmelzenthalpie deuteten ebenfalls auf eine Lokalisation der Lokalanästhetika im hydrophilen Kern hin [140]. Zu einem analogen Ergebnis aus der DSC-Messung kamen Ueda et al. [141].

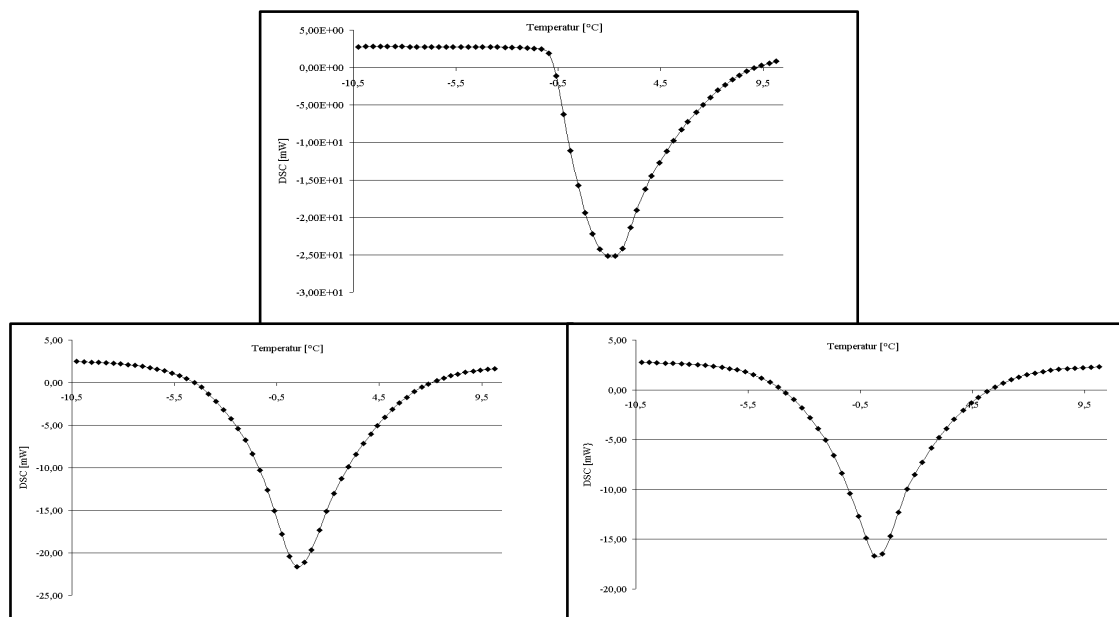


Abbildung 4.24 DSC von unbeladenen (oben) und mit 5 % Lidocain-HCl (unten links) bzw. Prilocain-HCl (unten rechts) beladenen Liposomendispersionen. Die Menge an Lecithin betrug 3 %

Nach Ueda et al. [141] beeinflussen Anästhetika den Phasenübergang in folgender Weise: Dabei deutet eine Veränderung der Phasenübergangstemperatur auf eine Lokalisation an der Oberfläche der Phospholipid hin, während sich eine Lokalisierung in der Membran in einer stärkeren Änderung der Form und Breite der Umwandlungskurve, und damit der Umwandlungsenergie, gezeigt hätte.

Somit bestätigen die DSC-Messungen die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung über die Lokalisation des Arzneistoffs.

Diese Beobachtung, dass sich Lidocain-HCl nur im hydrophilen Kern aufhält und sich nicht an der Struktur der Liposomen beteiligt, deckt sich mit Beobachtungen aus anderen Untersuchungen [142].

### **4.3.6 Wechselwirkungen zwischen Lecithin und dem Lokalanästhetikum**

#### **4.3.6.1 Kernresonanzspektroskopie**

Wechselwirkungen zwischen dem Lokalanästhetikum und Lecithin können außerdem durch kernresonanzspektroskopische Untersuchungen erfasst werden.

In Abhängigkeit von der Elektronendichte der Umgebung ist die effektive Feldstärke  $H_{\text{eff}}$  gegenüber der Feldstärke des angelegten Magnetfelds  $H_0$  abgeschwächt oder verstärkt. Ist  $H_{\text{eff}} > H_0$  spricht man von Abschirmung, d.h. das Signal der Resonanzfrequenz befindet sich im „höheren Feld“ (bei kleineren  $\delta$ -Werten). Der entgegengesetzte Fall tritt bei Entschirmung ( $H_0 > H_{\text{eff}}$ ) auf. Hier findet man eine Tieffeldverschiebung (bei höheren  $\delta$ -Werten).

Während sich sowohl das  $^1\text{H}$ -Spektrum (Abb. 4.25) als auch das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Abb. 4.26) der lokalanästhetikahaltigen Liposomdispersion rein additiv aus den Spektren der Einzelsubstanzen ergab und somit Bindungen, die mit einer Änderung der Elektronendichte verbunden wären, auszuschließen waren, lieferten  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen eine Abhängigkeit der chemischen Verschiebung des Phosphors von der Konzentration an Lokalanästhetikum.

Die Fokussierung auf den  $^{31}\text{P}$ -Heteroatomkern erleichtert das Erkennen von Strukturveränderungen einerseits, da das Phosphoratom nur einmal pro Phospholipidmolekül vorkommt, und zwar im hydrophilen Kopfbereich.

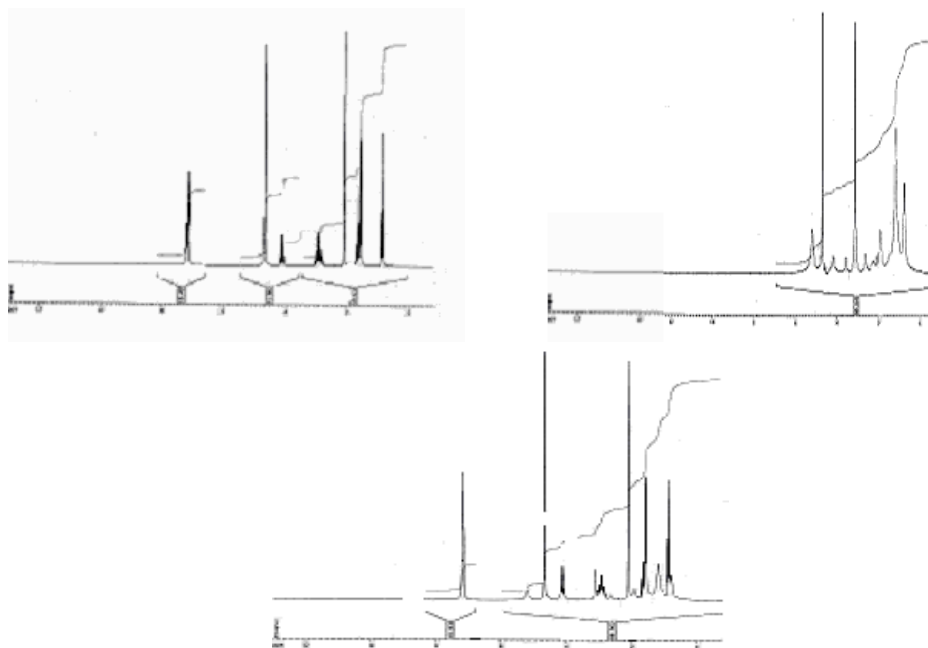


Abbildung 4.25 Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der lokalanästhetikahaltigen Liposomzubereitung (unten) ergibt sich rein additiv aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Lokalanästhetikums (oben links) und dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der unbeladenen Liposomdispersion (oben rechts). Beispielhaft dargestellt für Prilocain-HCl

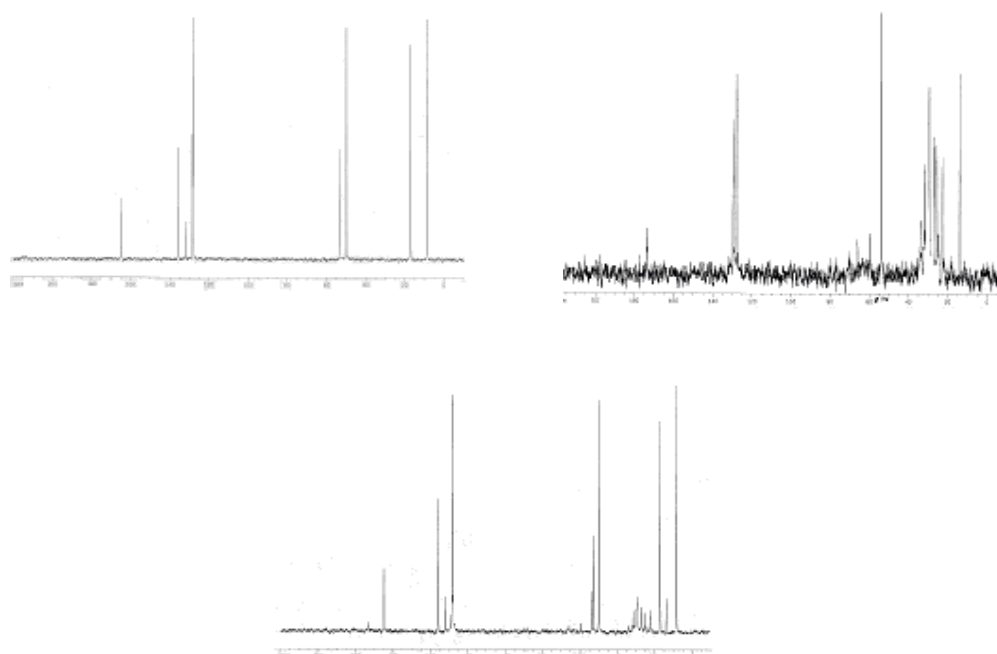


Abbildung 4.26 Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der lokalanästhetikahaltigen Liposomzubereitung (unten) ergibt sich rein additiv aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Lokalanästhetikums (oben links) und dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der unbeladenen Liposomdispersion (oben rechts). Beispielhaft dargestellt für Lidocain-HCl

In Abbildung 4.27 ist das  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum einer unbeladenen Liposomdispersion mit einem Phospholipidgehalt von 3 % (m/m) dargestellt. Hier wurde für die chemische Verschiebung ein Wert von 0,30637 ppm gefunden. Sollten bei 3 % (m/m) interpartikuläre Wechselwirkungen der Phospholipidmoleküle oder der Liposomen untereinander auftreten, würde sich das in einer Signalaufspaltung, einer Signalverbreiterung oder einer Signalverschiebung äußern. Dieses konnte nicht beobachtet werden, somit können interpartikuläre Wechselwirkungen ausgeschlossen werden.

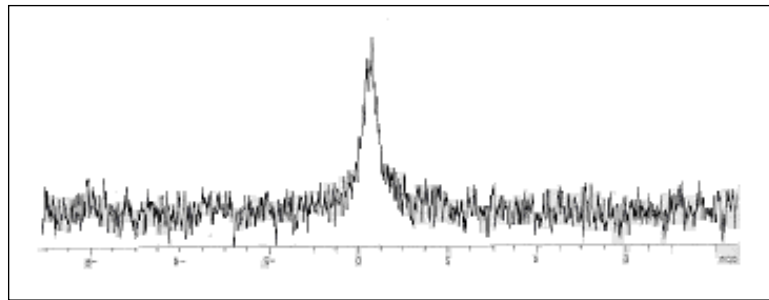


Abbildung 4.27  $^{31}\text{P}$ -NMR der arzneistofffreien Liposomendispersion

In Abbildung 4.28 sind exemplarisch  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von Proben, die neben 3 % Lecithin auch 10 % Lokalanästhetikum enthalten, dargestellt. Das Ausgangssignal von 0,30637 ppm ist in den mit Lokalanästhetikum beladenen Proben nicht mehr vorhanden. Durch den Zusatz von Lokalanästhetika wird die Lage des Signals im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum der Liposomendispersion deutlich hochfeldverschoben. Es kommt also zu einer Abschirmung des Phosphors sowohl im Inneren der Liposomen als auch auf ihrer Oberfläche. Damit ist nicht nur eine Interaktion zwischen Lokalanästhetikum und Liposomen belegt sondern auch eine Inkorporierung der Lokalanästhetikamoleküle im Inneren der Liposomen. Die chemische Verschiebung ändert sich mit der Konzentration an Lokalanästhetikum (Tabelle 4.7).

Es dürften keine unbeladenen Liposomen mehr vorliegen. Andernfalls hätte eine Signalaufspaltung detektiert werden müssen. Ebenso kann die Bildung von Mischmizellen ausgeschlossen werden. Im Falle einer Mischmizellbildung hätte in Übereinstimmung mit Literaturdaten [143] eine wesentlich höhere Hochfeldverschiebung bis zu negativen Werten beobachtet werden müssen.

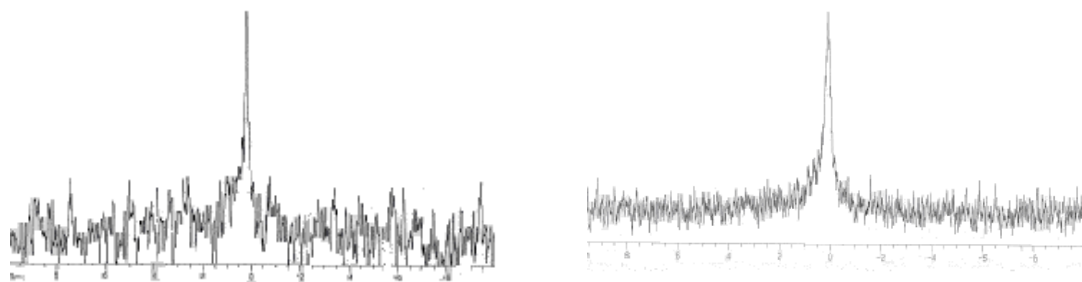


Abbildung 4.28  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Liposomen aus 3 % Lecithin und 10 % Lidocain-HCl (links) bzw. Prilocain-HCl (rechts)

Probe	Konz. LA [%]	Konz. Lecithin [%]	Chem. Verschiebung $\delta$ [nm]
Lecithin		3	0,30637
Lidocain-HCl	5	3	0,2418
Lidocain-HCl	10	3	0,2102
Lidocain-HCl	15	3	0,12914
Lidocain-HCl	20	3	0,19868
Prilocain-HCl	10	3	0,09154
Prilocain-HCl	15	3	0,13603
Prilocain-HCl	5	6	0,11624
Prilocain-HCl	10	6	0,18528
Prilocain-HCl	15	6	0,10971

Tabelle 4.7 Chemische Verschiebung der Phosphatgruppe des Lecithins im  $^{31}\text{P}$ -NMR in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Lokalanästhetikum

---

#### **4.3.6.2 Aufnahme von Langmuir-Isothermen mit dem Langmuir-Blodgett-Trog**

Die Wechselwirkungen zwischen Lokalanästhetikum und Phospholipid können mit dem Langmuir-Blodgett-Trog untersucht werden (Abbildung 3.2). Bei dieser Messmethode wird auf die Subphase eine Lösung von Lecithin in Chloroform gegeben. Nach Abdampfen des Lösungsmittels liegt das Lecithin in einer monomolekularen Schicht auf der Subphase vor. Als Subphase wurden hochreines Wasser oder 0,05 % Lösungen der Lokalanästhetika benutzt. Die Konzentration der Subphase an Lokalanästhetikum ergab sich aus dem in der Gebrauchsinformation der Propofol-Emulsion genannten Verhältnis [127]. Danach wurden 20 Teile einer 1 % Propofol-Emulsion (auch 1 % bezogen auf das Lecithin) und 1 Teil einer 1 %-igen Lidocain-HCl Lösung gemischt.

Durch die bewegliche Barriere kann die dem Monolayer zur Verfügung stehende Oberfläche variiert werden, wobei der Monolayer Kräfte analog derjenigen in den verschiedenen Aggregatzuständen erfährt. Steht den filmbildenden Teilchen eine sehr große Fläche zur Verfügung, so erfahren sie keine gegenseitigen Wechselwirkungen. Man bezeichnet diesen Abschnitt der Isothermen als gasanalogen Zustand. Bei Verringerung der zur Verfügung stehenden Fläche erfahren die Moleküle in zunehmendem Maße Wechselwirkungen. Dieser Vorgang entspricht dem Übergang zum flüssigen System (1), exemplarisch an einem Beispiel in Abbildung 4.29 gezeigt. Eine weitere Verringerung der Fläche führt zu einem festkörperanalogen Zustand (2). Es folgt der Kollapspunkt (3), an dem die Monoschicht zerstört wird. Ausgehend vom Kollapspunkt legt man eine Tangente an den Abschnitt 2. Der Schnittpunkt dieser Tangente mit der x-Achse liefert den Flächenbedarf des Moleküls (4).

Der Lateraldruck kann direkt aus der auf die Barriere wirkenden Kraft berechnet werden. Er wird über die an einem Filterpapierblättchen angreifenden Kräfte durch ein Wilhelmy-Messsystem gemessen.

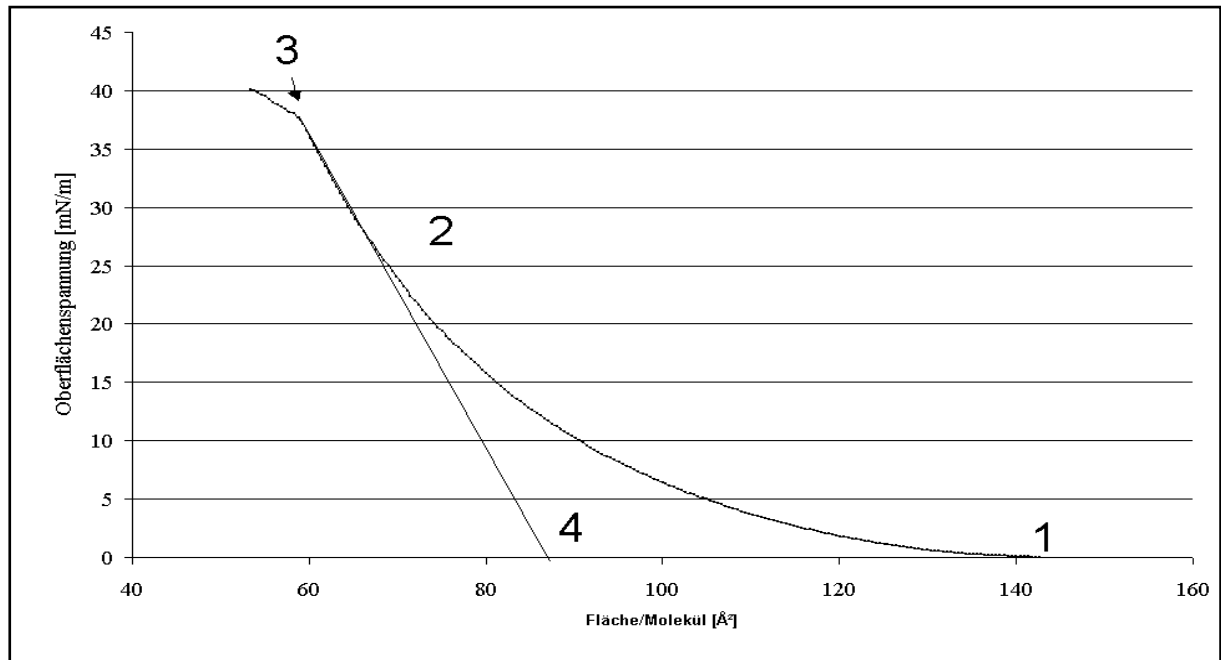


Abbildung 4.29 Langmuir-Isotherme von Lecithin über einer 0,05 %-igen Lösung von Lidocain-HCl als Subphase

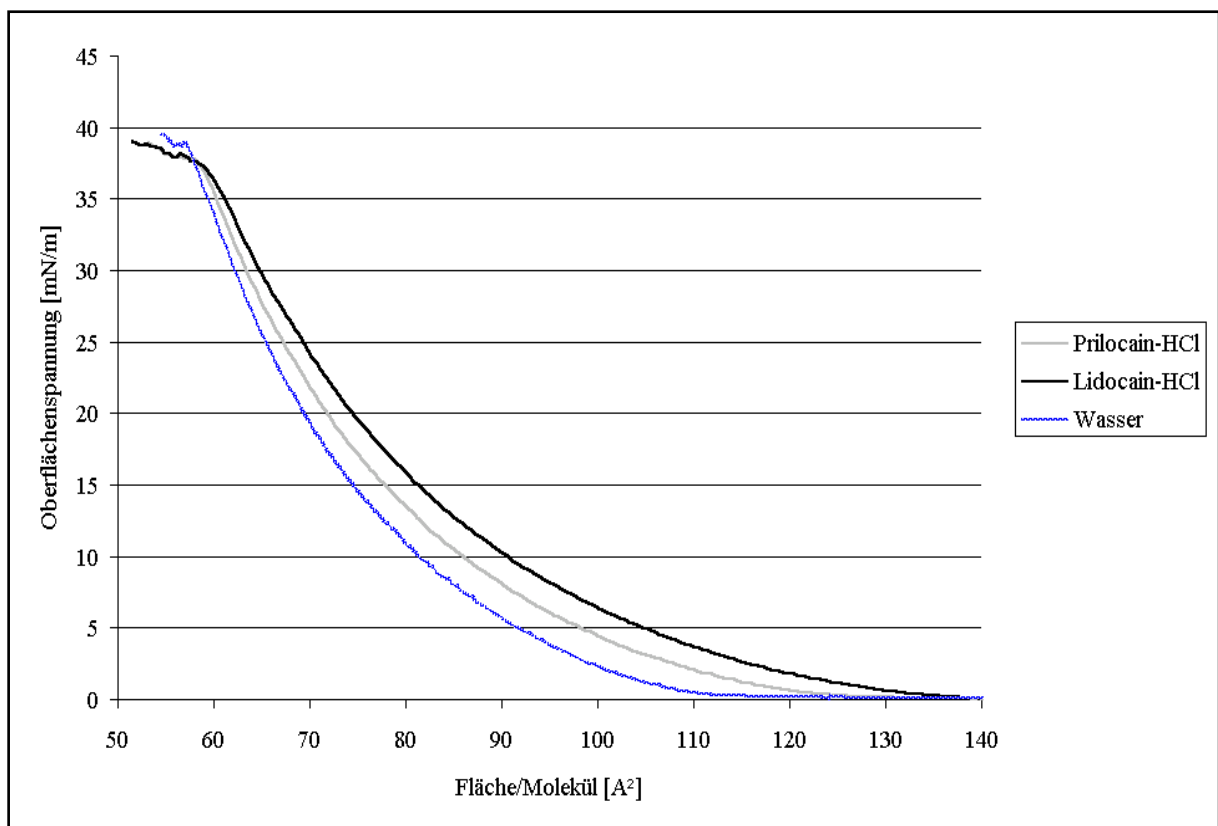


Abbildung 4.30 Die Isothermen des Lecithins in Abhängigkeit der verschiedenen Subphasen



Nach Auswertung der Isothermen (Abbildung 4.30) anhand der oben genannten Methode ergab sich der in Abbildung 4.31 dargestellte Platzbedarf, in Abhängigkeit von den verschiedenen Subphasen.

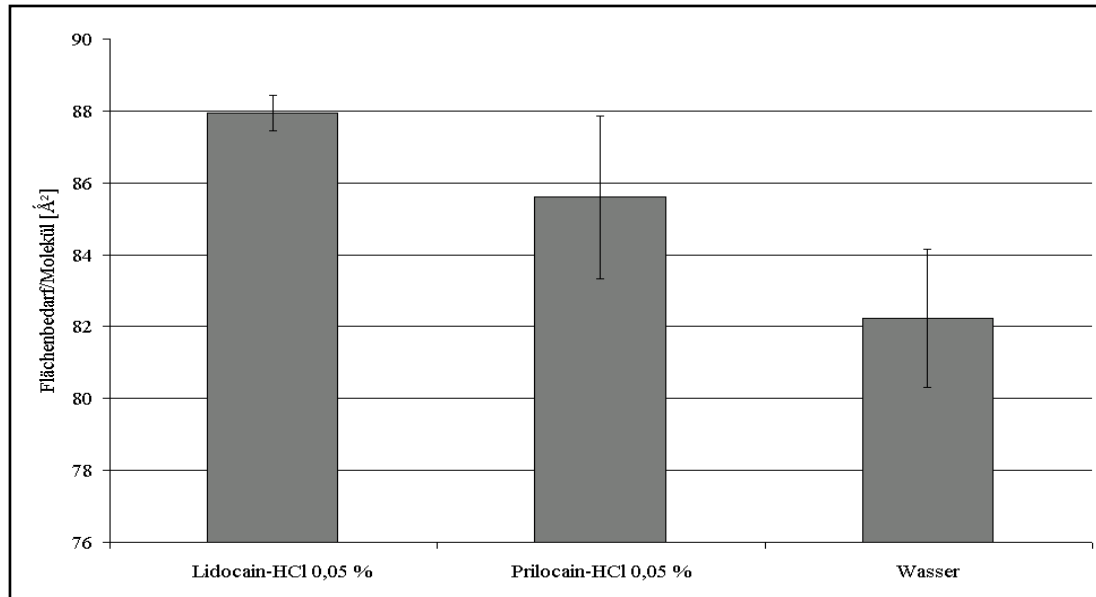


Abbildung 4.31 Platzbedarf des Lecithinmoleküls, abhängig von der Zusammensetzung der Subphase (n=3)

Lecithinmonolayer ließen sich mit reinem Wasser als Subphase auf die kleinste Fläche mit einem Platzbedarf von  $82,23 \pm 1,92 \text{ Å}^2$  pro Lecithinmolekül komprimieren. Dahingegen führte die Verwendung einer 0,05 %-igen Lösung von Lidocain-HCl als Subphase zu einem vergrößerten Platzbedarf des Lecithinmoleküls von  $87,95 \pm 0,50 \text{ Å}^2$ . Der Flächenbedarf des Lecithinmoleküls, der unter der Verwendung einer 0,05 %-igen Lösung von Prilocain-HCl als Subphase mit  $85,60 \pm 2,26 \text{ Å}^2$  erhalten wurde, lag zwischen den beiden erst genannten. Der erhöhte Platzbedarf bei Verwendung einer lokalanästhetikahaltigen Subphase wird wie folgt erklärt:

Durch den Einbau des Lokalanästhetikums in den Monolayer müssen die Lecithinmoleküle weiter auseinander weichen. Es sind also pro Flächeneinheit weniger Lecithinmoleküle vorhanden. Dieses ergibt dann einen größeren Platzbedarf pro Lecithinmolekül (Abbildung 4.32).

Die erhaltenen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Ergebnissen in der Literatur, die einen abnehmenden Flächenbedarf pro Molekül mit steigender Lokalanästhetikakonzentration beschreiben [144]. Bei den letztgenannten Untersuchungen wurde das Lokalanästhetikum jedoch in dem die Monoschicht bildenden Anteil gelöst (Abbildung 4.33), und nicht wie in der vorliegenden Untersuchung der Subphase hinzugefügt (Abbildung 4.32), was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

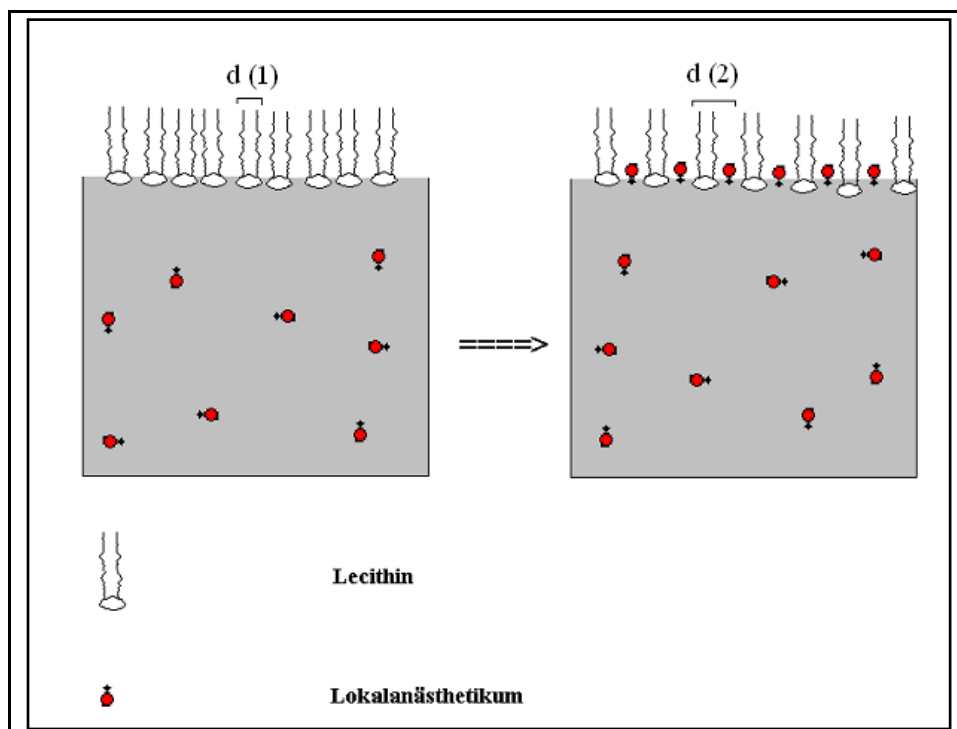


Abbildung 4.32 Schematische Darstellung des Platzbedarfes von Lecithin bei Verwendung einer lokalanästhetikahaltigen Subphase

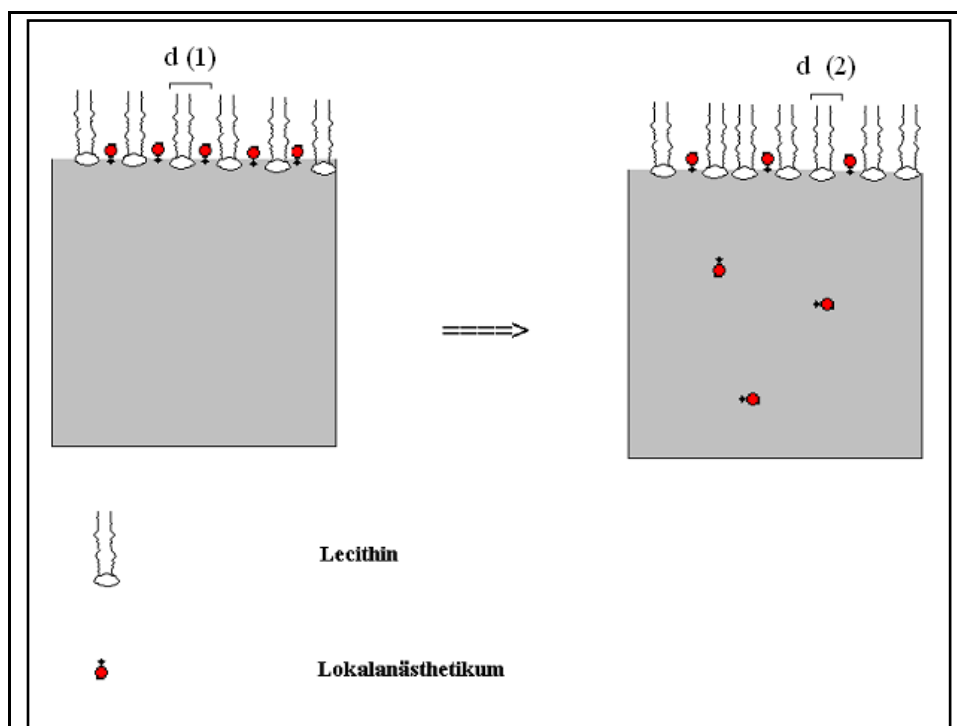


Abbildung 4.33 Schematische Darstellung des Platzbedarfes von Lecithin bei Verwendung einer lokalanästhetikahaltigen Monoschicht

Die schematischen Darstellungen der Abbildungen 4.32 und 4.33 sollen verdeutlichen, wie sich der Platzbedarf des Lecithins ändert, wenn das Lokalanästhetikum der Monoschicht oder Subphase zugesetzt wird. Ist das Lokalanästhetikum bereits zu Beginn des Versuchs in der Monoschicht, wird es sich in die Subphase umverteilen. Dies geht mit einer Abnahme des Platzbedarf einher ( $d(1) > d(2)$ ) (Abbildung 4.33). Befindet sich das Lokalanästhetikum jedoch in der Subphase, diffundieren Moleküle in die Monoschicht des Lecithins was zu einer Zunahme des Platzbedarf des Lecithinmoleküls führt ( $d(1) < d(2)$ ) (Abbildung 4.32).

In ihren Versuchen beobachteten Kane und Floyd Interaktion zwischen dem Lokalanästhetikum und der Phospholipidkopfgruppe des Lecithins. Diese erklärten sie mit elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen einerseits dem protonierten Ammoniumion und einem Elektronenpaar des Lokalanästhetikums, und andererseits der Phosphatgruppe und dem protonierten Ammonium des Dipalmitoylphosphatidylcholins [144]. Diese Untersuchungen führten Kane und Floyd mit dem Lokalanästhetikum Dibucain durch, ein analoger Mechanismus ist aber auch für Prilocain und Lidocain denkbar.

#### 4.3.6.3 Infrarot-Spektroskopie

Zur Untersuchung, ob neben elektrostatischen Wechselwirkungen noch andere Bindungskräfte bei der Interaktion zwischen Lecithin und dem Lokalanästhetikum beteiligt sind, wurden infrarotspektroskopische Messungen gemacht. Hierbei wurden gefriergetrocknete Proben vermessen, um an die Anwesenheit von Wasser gebundene Wechselwirkungen zu vermeiden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob trotz Abwesenheit von Wasser Wechselwirkungen zwischen Lecithin und dem Lokalanästhetikum fortbestehen, die in wässrigen Systemen existieren. Dazu wurden Fourier transformierte Infrarotspektren (FT-IR Spektren) der gefriergetrockneten Proben einer arzneistofffreien Liposomdispersion und von Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl-haltigen Liposomdispersionen verglichen.

Der Vergleich zeigte, dass eine Beladung mit dem Lokalanästhetikum (Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl) das Spektrum insofern verändert, als die Absorptionsbanden des jeweiligen Lokalanästhetikums neben denen der Liposomen zu detektieren sind. Da die Absorptionsbanden des liposomalen Systems durch die Beladung mit dem Lokalanästhetikum ihre Position nicht verändern, kann angenommen werden, dass Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl im gefriergetrockneten Zustand die Struktur des Lecithins nicht verändert (Abbildung 4.34)

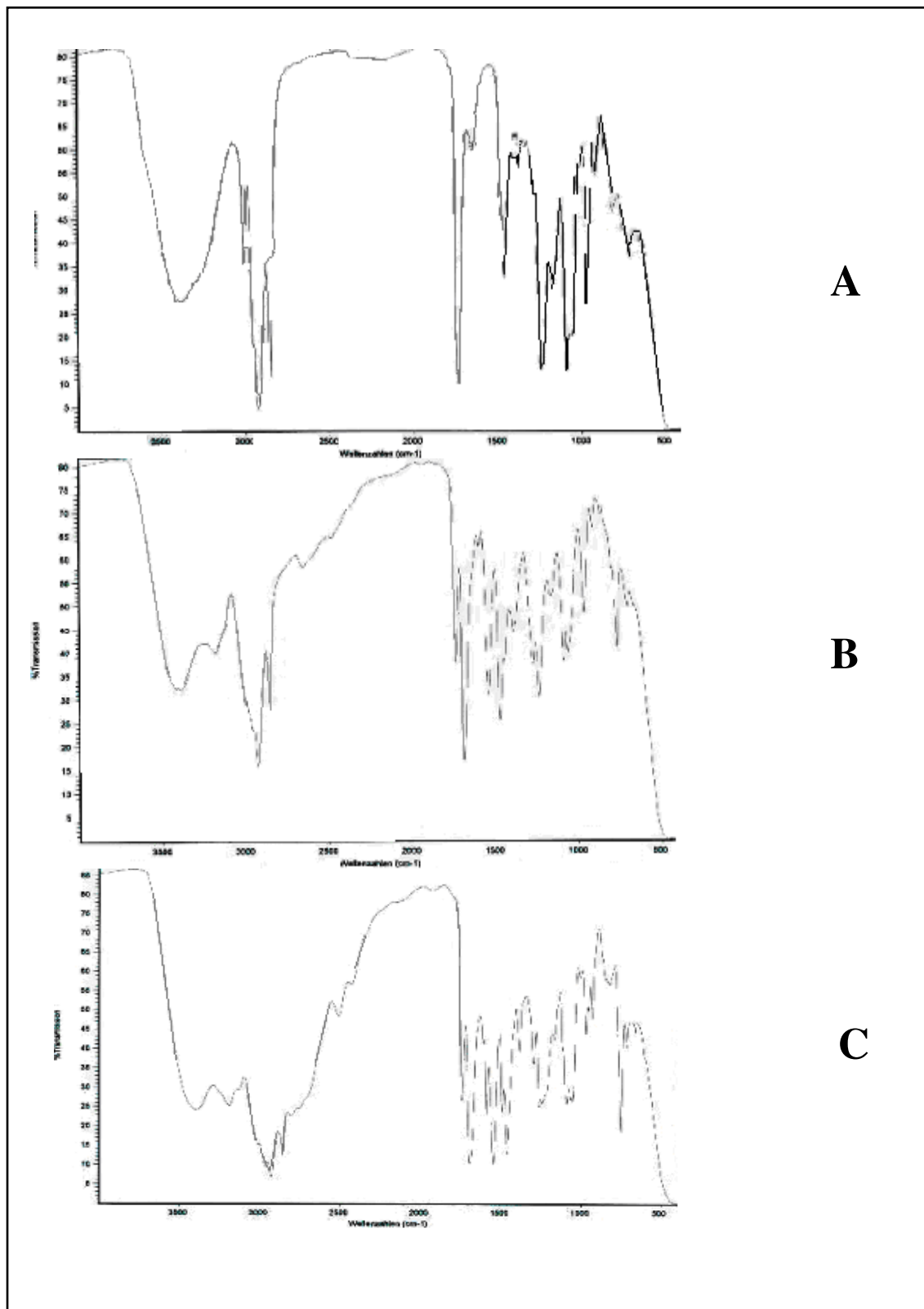


Abbildung 4.34 FT-IR Spektren von gefriergetrockneten Liposomdispersionen mit 3 % Lecithin. Arzneistofffrei (A), mit 5 % Lidocain-HCl (B), mit 5 % Prilocain-HCl (C)

#### 4.3.6.4 Fluoreszenzuntersuchungen

Eine weitere Methode, Wechselwirkungen zwischen dem amphiphilen Arzneistoff und dem Phospholipid zu erfassen, beruht auf Fluoreszenzuntersuchungen. Dazu nutzt man den Fluoreszenzfarbstoff 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS). Dieser zeigt in wässriger Lösung nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität. Diese steigt aber deutlich an, wenn ANS über seine anionische Sulfonatgruppe an ein Makromolekül (z.B. ein Phospholipid) gebunden wird.

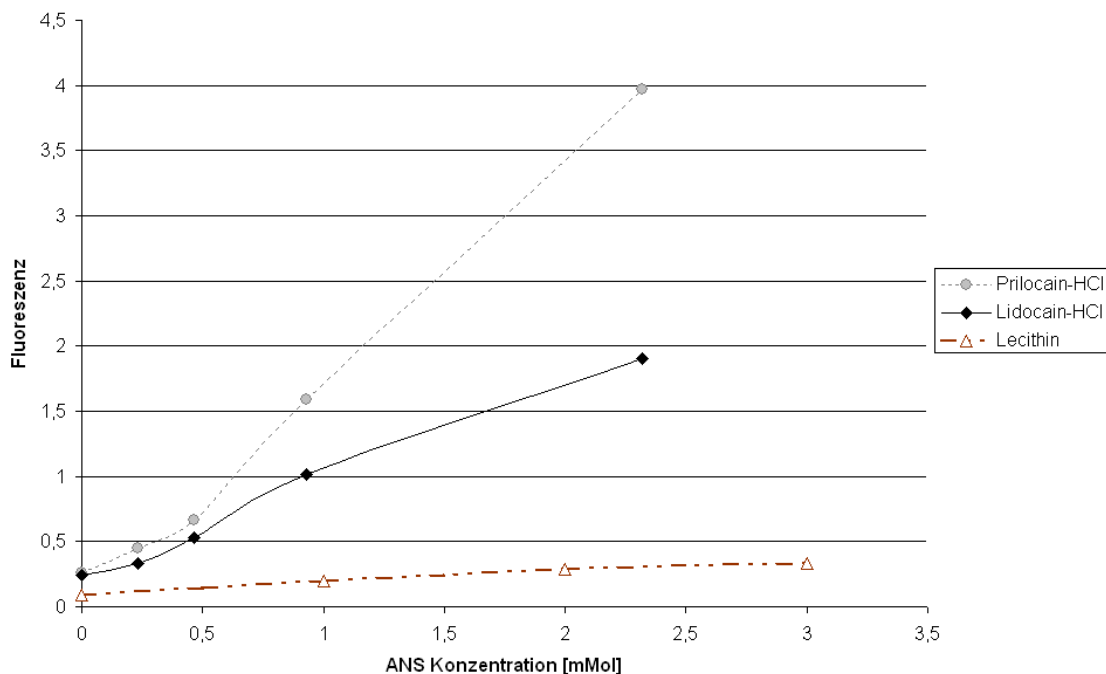


Abbildung 4.35 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der ANS Konzentration für Liposomdispersionen 3 % Lecithin und 5 % Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl

Die Bindung des ANS an das Phospholipid erfolgt in der Weise, dass die anionische Sulfonatgruppe des Farbstoffs zur hydrophilen Kopfgruppe des Phospholipids orientiert ist, genauer an das Cholin-Kation bindet [145, 146]. Kationische Wirkstoffe wie Lokalanästhetika binden an die Phosphatgruppe des Phospholipids, und verstärken damit die kationische Ladung im Cholin-Teil. Dadurch kann die ANS Bindung gefestigt werden und die Fluoreszenzintensität nimmt zu.

Der Zusatz beider Lokalanästhetika führt deshalb zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu reinem Lecithin (Abbildung 4.35).

Die Stabilität der Arzneistoff-Lecithin-Bindung ist mit unpolareneren Arzneistoffen größer als mit polaren. Daher bildet das hydrophobere Prilocain-HCl mit dem Lecithin beständigere Bindungen aus als das hydrophilere Lidocain-HCl, was in höheren Fluoreszenzintensitäten resultiert (Abbildung 4.35).

#### **4.3.7 Bestimmung der Doppelschichtdicke unilamellarer Liposomen, des Interlamellarabstands oligo- bzw. multilamellarer Liposomen sowie der Lamellenzahl durch Röntgenuntersuchungen (SAXS)**

Regelmäßig wiederkehrende Abstände in geordneten Strukturen sind mit Röntgenstreuungsmethoden bestimmbar. Aus messtechnischen Gründen – eine Probenpräparation für die Kiessig-Technik war nicht möglich – wurden SAXS-Untersuchungen mit der Kratky-Kamera durchgeführt.

Die Streukurve der SAXS-Messung für die liposomale Zubereitung ohne Arzneistoff zeigt ein Maximum bei  $h \approx 0.9 \text{ nm}^{-1}$ , dem, gemäß der Braggschen Gleichung (Gleichung 3.1), eine Wiederholungsdistanz von  $d \approx 7.0 \text{ nm}$  entspricht. Im Vergleich mit den arzneistofffreien Vesikeln sind die Streukurven der sowohl mit Lidocain-HCl als auch mit Prilocain-HCl beladenen Liposomen geringfügig breiter. Offensichtlich beeinflusst die Art des Lokalanästhetikums, mit dem das Liposom beladen wurde, die Liposomstruktur nur wenig.

Bouwstra et al. [147] verglichen die Streukurven von Liposomen unterschiedlicher Lamellenzahl und kamen zu dem Schluss, dass eine zunehmende Schärfe der Streukurve mit einer Zunahme der Lamellenzahl korreliert. Vor diesem Hintergrund könnte die Streukurve der arzneistofffreien Liposomen als Addition der Streukurve unilamellarer und oligolamellarer Liposomen gesehen werden (Abbildung 4.36), während die Streukurven der lokalanästhetikahaltigen Liposomen eher unilamellare Vesikel repräsentieren. Lokalanästhetikahaltige Liposomen deuten also auf eine Abnahme der Lamellenzahl hin [148].

Um die Eigenschaften der Wand der Liposomen näher zu beschreiben, wurde die Elektronenabstandsfunktion gemäß folgender Gleichung berechnet.

$$I(h)h^2 = 4\pi \int_0^{\infty} p_r(r) \cos(hr) dr \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

Die Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  misst Unterschiede der Elektronendichte. Die Breite der Doppelschicht ergibt sich als der Punkt, an dem  $p(r)$  endgültig Null erreicht [149], im Falle der unilamellaren Vesikel bei der dritten Nullstelle der Elektronenabstandsfunktion. Daraus folgt eine Lamellenbreite der unilamellaren Vesikel von  $d = 4,4 \pm 0,2$  nm (Abbildung 4.37).

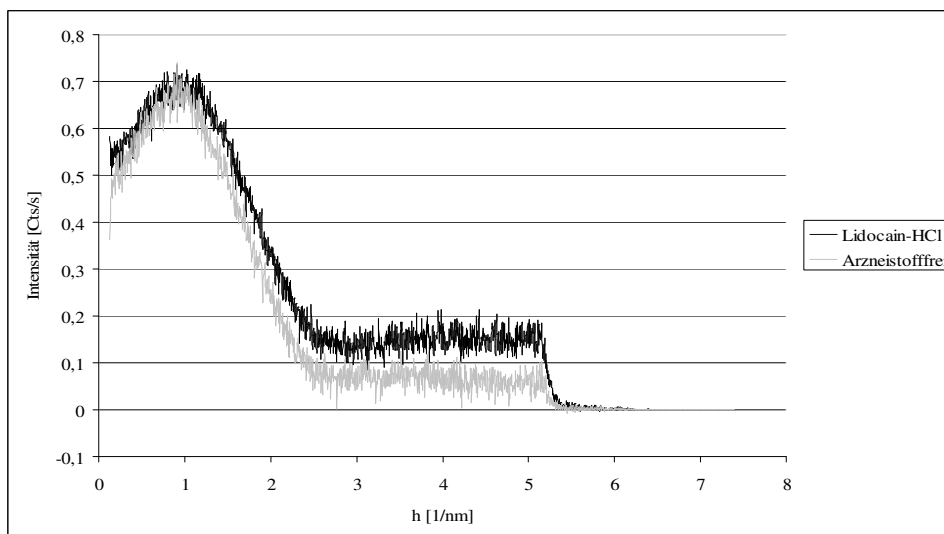


Abbildung 4.36 Entschmierte Streukurven der arzneistofffreien bzw. Lidocain-HCl-haltigen Liposomdispersion

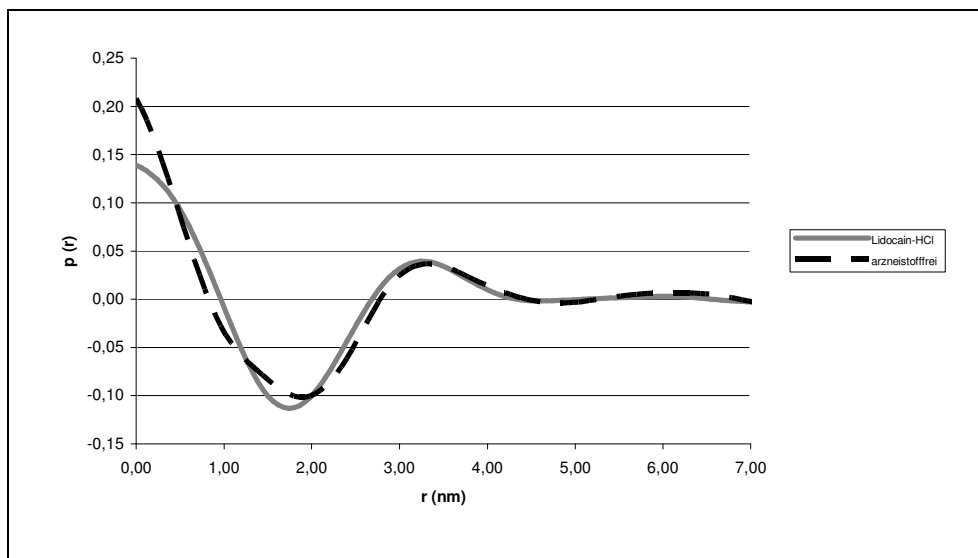


Abbildung 4.37 Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  der arzneistofffreien bzw. Lidocain-HCl-haltigen Liposomdispersion (Bilayer-Modell) aus [148]

Wie aus Abbildung 4.37 zu entnehmen ist beträgt der Durchmesser der Doppelschicht  $d = 4,4 \pm 0,2$  nm für die arzneistofffreien Liposomen. Die Beladung mit den Lokalanästhetika verändert die Membrandicke nur gering.

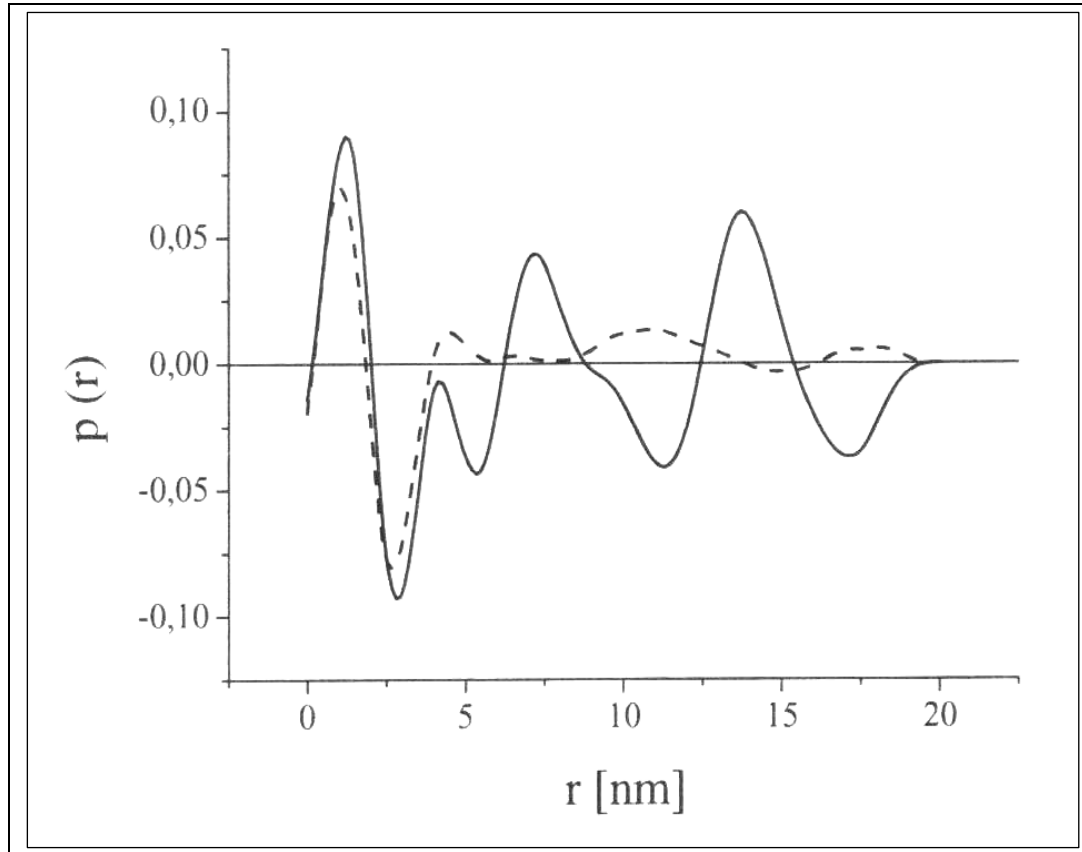


Abbildung 4.38 Elektronenabstandsfunktion  $p(r)$  der arzneistofffreien (—) bzw. Lidocain-HCl-haltigen (---) Liposomdispersion (Modellfreie Auswertung) (aus [148])

Zusätzliche Informationen über die Struktur der Liposomen lieferte eine Betrachtung der Ergebnisse der Streukurve in einem freien Modell. Abbildung 4.38 zeigt die Elektronenabstandsverteilung gemittelt über alle drei Dimensionen. Die Elektronenabstandsfunktion der arzneistoffhaltigen Liposomen zeigt zwei ausgeprägte Extremwerte der  $p(r)$ -Kurve, die sich aus der unterschiedlichen Elektronendichte der Liposomen ergaben. Dagegen zeigen die arzneistofffreien Systeme eine Fluktuation der Elektronendichte mit dem Abstand. Diese deuten auf einen Anteil oligolamellarer Liposomen hin. Der Abstand zwischen den Maxima der  $p(r)$ -Kurve liefert den Abstand der Lamellen, hier  $d = 6,2 \pm 0,2$  nm.

Dieser Wert stimmt nicht mit dem Wert  $d = 4,4 \pm 0,2$  nm aus der Querschnittsauswertung (Abbildung 4.37) überein, aber grob mit dem Lamellenabstand von unter 7,0 nm überein, der aus dem Maximum in der nicht entschmierten Streukurve (Abbildung 4.36) errechnet wurde.



Der Grund für diese unterschiedlichen Werte für die Lamellenbreite verbirgt sich in der Umgebung der Lamelle. Da sich in oligo- bzw. multilamellaren Vesikeln die Hydratationschicht in Bezug auf die Elektronendichte von der Umgebung unterscheidet, wird sie bei der Bestimmung der Lamellenbreite miteingefasst (Abbildung 4.39), sodass eine Breite von  $d = 6,2 \pm 0,2$  nm gemessen wird. Unilamellare Liposomen sind sicherlich in derselben Weise hydratisiert. Hier ist jedoch der Unterschied der Elektronendichte der Hydratationshülle zum umgebenden wässrigen Medium, zu gering, um bei dieser Messung aufgelöst zu werden. Daher bleibt die Hydratationshülle für die SAXS-Messung unsichtbar [150], und die gemessene Lamellenbreite reduziert sich auf die Breite des unhydratisierten Phospholipidbilayers. (Abbildung 4.37). Daraus folgt der kleine Wert für die Lamellenbreite von  $d = 4,4 \pm 0,2$  nm.

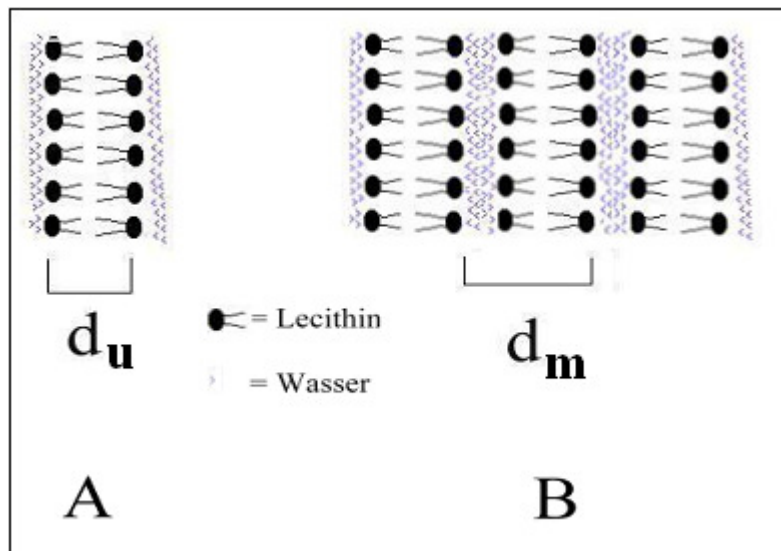


Abbildung 4.39 Schematische Darstellung der aus den SAXS-Messungen ermittelten Lamellenbreite  $d_u$  bzw.  $d_m$ . (A) ein unilamellares Liposom, (b) ein multilamellares Liposome

### 4.3.8 Messungen des Zetapotentials

Die Messungen des Zetapotentials scheiterten im ersten Anlauf daran, dass bei Lokalanästhetikazusatz zu viele nicht verkapselte Ionen des Lokalanästhetikums den Ladungstransport übernahmen. Dieses Problem wurde beseitigt, indem die arzneistoffbeladene Liposomdispersion nicht direkt nach der Herstellung, sondern erst nach Dialyse eingesetzt wurde. Hierzu wurde eine Probe von 5 ml in einem Dialyseschlauch für 14 h gegen Wasser dialysiert. Danach zeigten die lokalanästhetikahaltigen Liposomen gegenüber den arzneistofffreien Liposomen nur eine geringe Änderung des Zetapotentials (z.B.: Lidocain-HCl  $\xi = -6,2 \text{ mV} \pm 0,2 \text{ mV}$  zu unbeladenen Liposomen  $-8,3 \text{ mV} \pm 0,3 \text{ mV}$ ).

Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass entweder das Zetapotential der Liposomen nicht durch die Beladung mit den Lokalanästhetika beeinflusst wird, oder das Lokalanästhetikum während der Dialyse quantitativ aus den Liposomen entfernt wird.

### 4.3.9 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen

Um die Ergebnisse der Röntgenuntersuchung mit einem abbildenden Verfahren zu bestätigen, wurden Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen gemacht.

Aus den TEM-Aufnahmen, von denen beispielhaft zwei in Abbildung 4.39 zu sehen sind, ist die Partikelgröße direkt zugänglich. So ergibt sich in dem arzneistofffreien System für das große Vesikel eine Partikelgröße  $d = 200 \text{ nm}$  und für die kleineren Liposomen eine Größe von  $d = 25 \text{ nm}$  bis  $d = 75 \text{ nm}$ .

Das arzneistoffhaltige System zeigt hingegen größtenteils kleine Vesikel mit Partikelgrößen zwischen 10 und 50 nm und wenige, maximal 115 nm große Vesikel. Eine parallel durchgeführte Partikelgrößenbestimmung mit dem Zetasizer ergab eine mittlere Partikelgröße von  $d = 60 \text{ nm}$ .

Somit deuten auch diese Messungen auf eine Abnahme der Partikelgröße der lokalanästhetikahaltigen Liposomen hin. Diese Ergebnisse können durch eine Abnahme der Anzahl an Lamellen erklärt werden ((siehe Kapitel 4.3.7 Bestimmung der Doppelschichtdicke unilamellarer Liposomen, des Interlamellarabstands oligo- bzw. multilamellarer Liposomen sowie der Lamellenzahl durch Röntgenuntersuchungen (SAXS))).

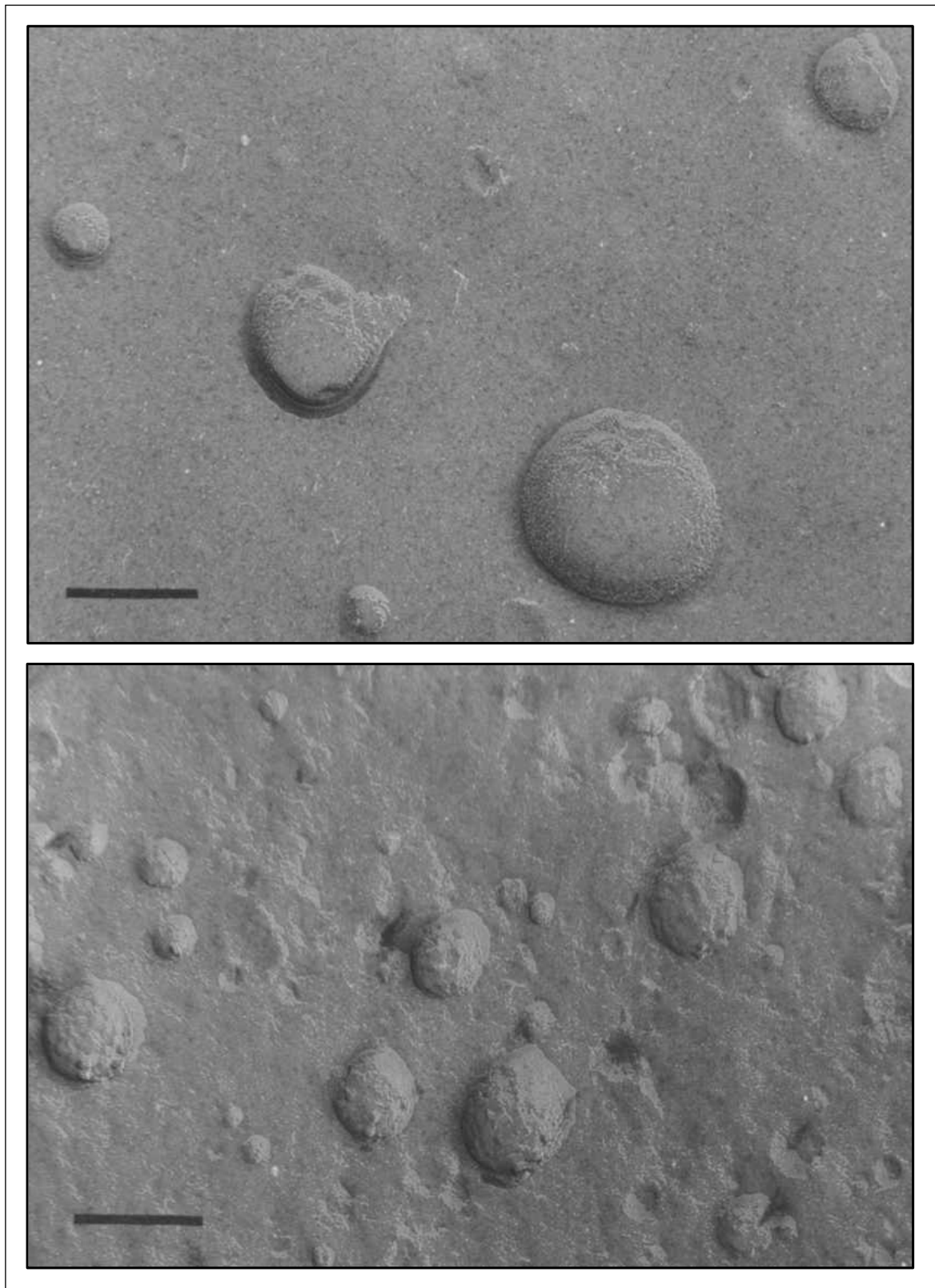


Abbildung 4.40 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von arzneistofffreien Liposomen (oben) und arzneistoffhaltigen (5 % Prilocain-HCl) (unten) Liposomdispersionen. Die Dispersionen enthielten 3 % an Lecithin und wurden mit der oben beschriebenen Ultraschallbehandlung hergestellt. (Balkenlänge entspricht 150 nm). (aus [148])

---

Eine Abnahme der Partikelgröße bei der Einarbeitung des amphiphilen Arzneistoffes wurde auch schon von anderen Autoren festgestellt [143].

Für die beobachtete Abnahme des mittleren Partikeldurchmessers kann man verschiedene Erklärungsmodelle heranziehen.

Einerseits könnte die Abnahme des mittleren Partikeldurchmessers durch Veränderung des Packungsparameters (Kap. 2.4) des Lecithins erfolgen. (Eine Wechselwirkung zwischen Lecithin und dem Lokalanästhetikum würde eine Veränderung des Packungsparameters des Lecithins bewirken.) Andererseits kann die reduzierte Anzahl großer, oligolamellarer Liposomen in den arzneistoffhaltigen Systemen (Abbildung 4.40) den mittleren Partikeldurchmesser reduzieren. (Wie in Abschnitt 3.2.7 ausgeführt, wird bei der PCS zur Größenbestimmung ( $d$ =Durchmesser der Partikel) die Streulichtintensität  $I$  herangezogen. Da  $I \sim d^6$  ist, bewirkt schon ein kleiner Anteil von oligolamellaren Vesikeln eine deutliche Erhöhung der Streulicht-intensität und folgend des intensitätsgewichteten  $z$ -averages.)

Die Versuchsergebnisse unterstützen die erste These. Die Wechselwirkung zwischen Lecithin und dem Lokalanästhetikum konnte im Kapitel 4.3.6 gezeigt werden. Die Fluoreszenzuntersuchungen (Kapitel 4.3.5.1) und die Messungen des Zetapotentials (Kapitel 4.3.8) lassen vermuten, dass sich das Lokalanästhetikum im Inneren der Liposomen aufhält und nicht in der Wand.

---

### 4.3.10 Lagerung

Um strukturelle Veränderungen der Systeme während der Lagerung zu beurteilen, wurde sowohl die arzneistoffhaltige als auch die arzneistofffreie Liposomdispersion auf drei Arten gelagert (bei 4 °C, bei 20 °C und unter Stresstestbedingungen, d.h. jeden Tag 12 Stunden

–5°C dann 12 Stunden 40°C). In bestimmten Abständen wurden Proben entnommen und von diesen die Partikelgröße und deren Verteilung ermittelt. Wenn der Polydispersitätsindex einen Wert von 0,5 überschritt, wurde die Probe als instabil angesehen und die Lagerung nicht weiter fortgesetzt.

Bei Inkorporation von Lidocain-HCl konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nagarsenker und Joshi [151] bei einer Lagerung bei 4 °C während einer Lagerzeit von

32 Wochen keine negativen Effekte auf Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung beobachtet werden. Nach 36 Wochen wurde die Lagerung abgebrochen, da ein Polydispersitätsindex  $> 0,5$  zeitgleich mit einer Partikelgrößenzunahme erreicht wurde (Abbildung 4.42).

Ein Polydispersitätsindex  $> 0,5$  wurde bei einer Lagerung bei 20 °C nach 13 Wochen und bei einer Lagerung unter Stressbedingungen bereits nach 9 Wochen erreicht.

Diese Lagerzeiten entsprechen in etwa denen für die arzneistofffreien Liposomen (Abbildung 4.41 und 4.42), sodass angenommen werden kann, dass nur das Lecithin die Stabilität dieser Liposomen bestimmt, während der Zusatz von Lidocain-HCl sie nicht negativ beeinflusst. Es sieht eher so aus, als ob Lidocain stabilisierend wirkt.

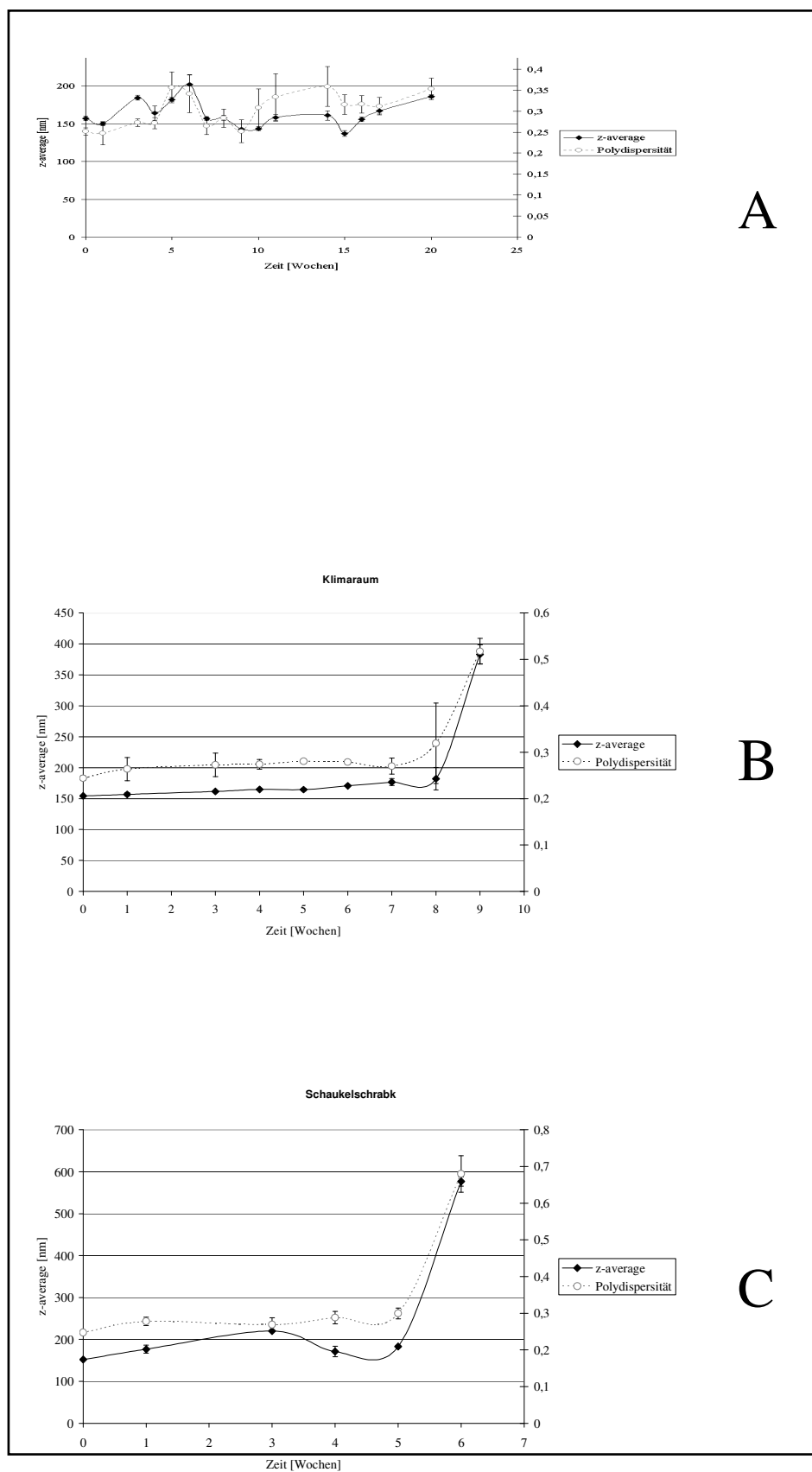


Abbildung 4.41 Lagerung von arzneistofffreien Liposomen bei 4 °C (A), 20 °C (B) oder unter Stressbedingungen (C)

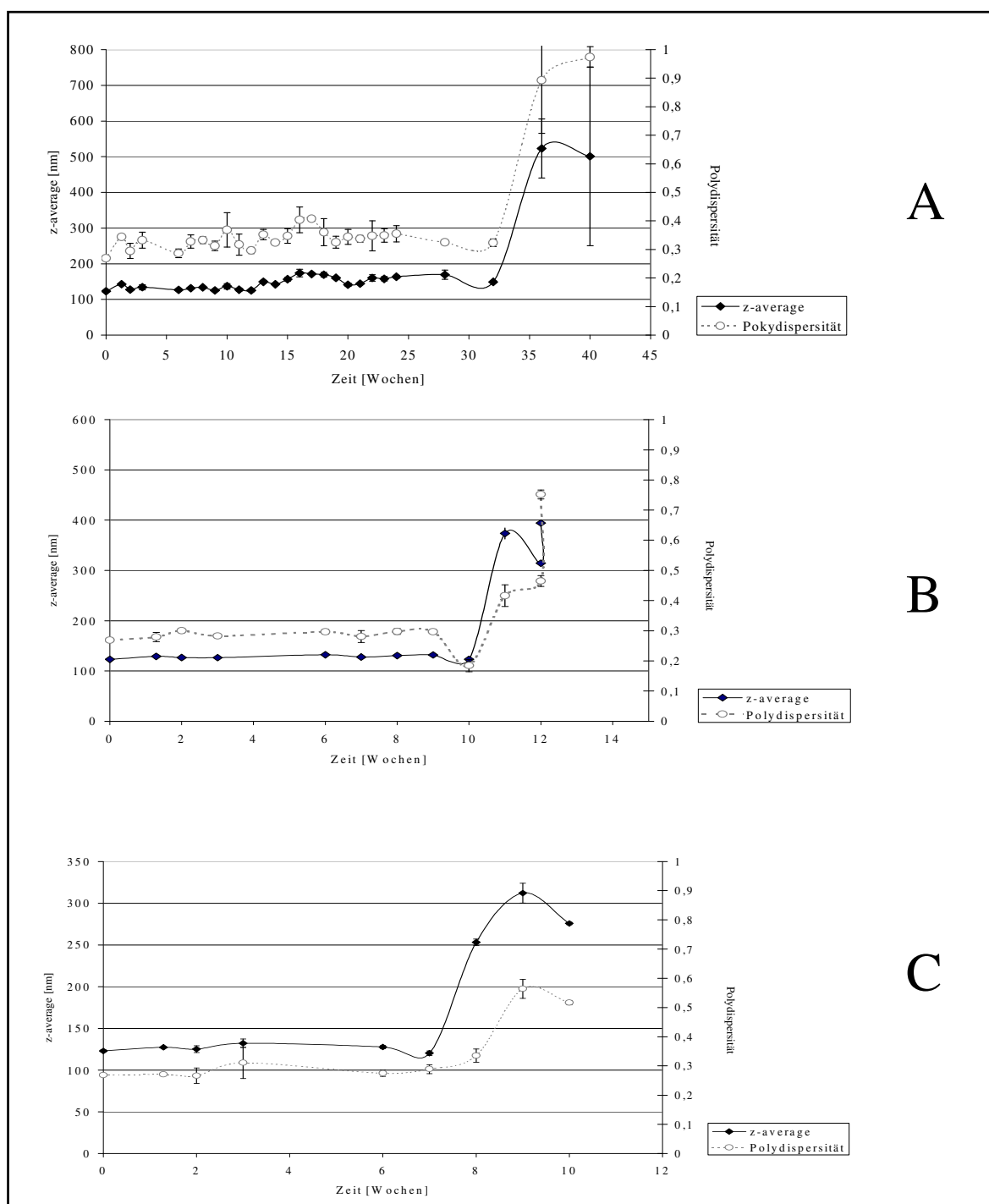


Abbildung 4.42 Lagerung von Lidocain-HCl haltigen Liposomen bei 4 °C (A), 20 °C (B) oder unter Stressbedingungen (C)

Ein anderes Ergebnis lieferte die Lagerung Prilocain-HCl haltiger Liposomen. Diese zeigten in den Partikelgrößenverteilungen bereits nach der Herstellung eine sehr große Polydispersität. Bessere Ergebnisse erhielt man erst, wenn man den Lecithinanteil von 3% auf 5 %, d.h. auf eine Menge erhöhte, die der Menge an Prilocain-HCl entsprach (Abbildung 4.43).

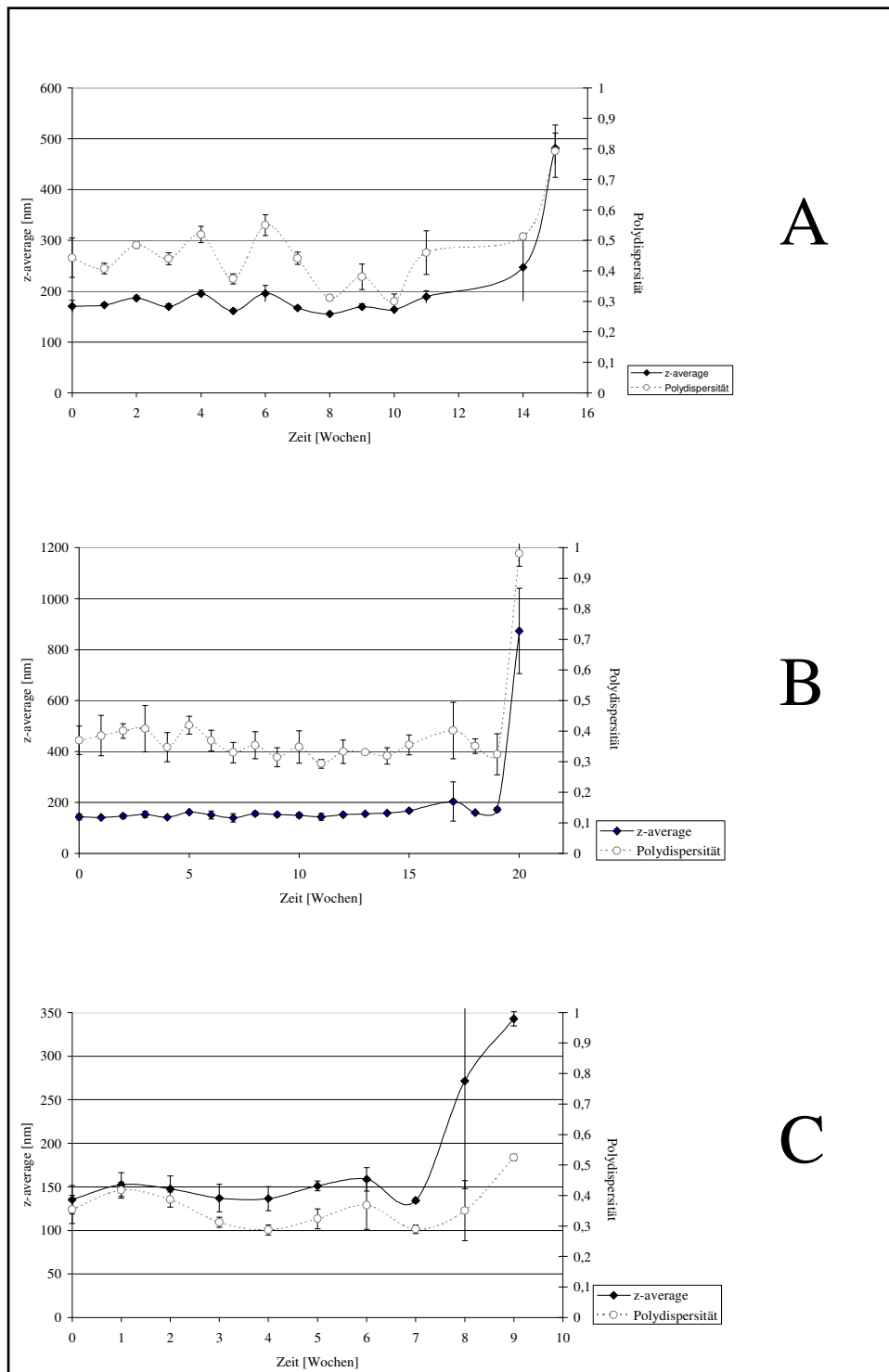


Abbildung 4.43 Lagerung von Prilocain-HCl haltigen Liposomen (statt 3 % mit 5 % Lecithin) bei 4 °C (A), 20 °C (B) oder unter Stressbedingungen (C)



Da eine Erhöhung der Lecithinmenge die Herstellung stabilerer Prilocain-HCl-haltiger Liposomen ermöglichte, scheint die Stabilität vom Verhältnis Lecithin zu Prilocain-HCl abzuhängen. Um dieses zu überprüfen, wurde eine Liposomdispersion mit einer sehr geringen Menge an Prilocain-HCl beladen. Die Lagerung der Probe, die 0,98 % Prilocain-HCl neben 3,17 % Lecithin enthielt, erfolgte bei 4 °C.

Wie Abbildung 4.44 zeigt, führt die Reduktion der Menge an Prilocain-HCl zu einer Lagerstabilität, die denen der arzneistofffreien Liposomen vergleichbar war. Dieses bestätigt die These, dass die Stabilität dieser Liposomen vom Verhältnis Prilocain-HCl zu Lecithin abhängt.

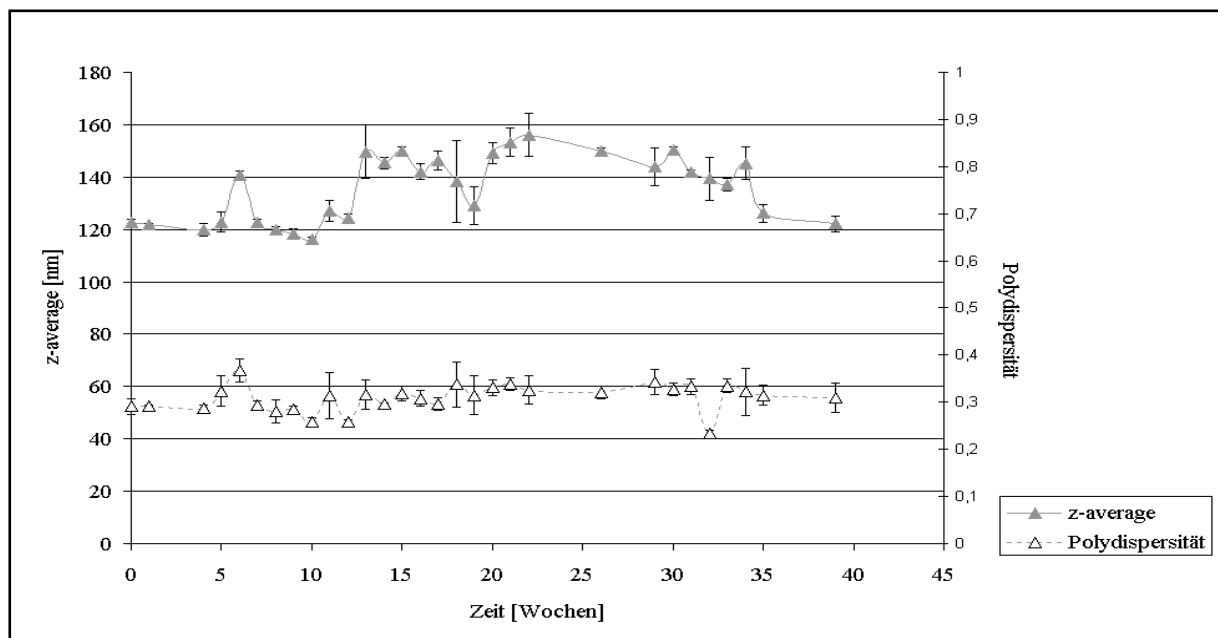


Abbildung 4.44 Lagerung einer Probe bei 4°C die 0,98 % Prilocain-HCl und 3,17 % Lecithin enthält

Allerdings scheint diese Abhängigkeit chargenspezifisch in Bezug auf das Phospholipid zu sein. So traten die Stabilitätsprobleme der mit 3 % Lecithin hergestellten Liposomen nur bei Verwendung von Charge 90500 auf. Bei der Herstellung unter Verwendung von drei weiteren Lecithin-Chargen, (davon zwei Chargen, die im Arbeitskreis für andere Projekte eingesetzt wurden), traten diese nicht mehr auf. Der Vergleich der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung von Prilocain-HCl-haltigen Liposomendispersionen, die einerseits mit frisch geöffnetem, andererseits mit 1 Jahr offen im Gefrierschrank gelagertem Lecithin hergestellt wurden ergab keine Unterschiede.

### 4.3.11 Gefriertrocknung

Wie in den vorhergehenden Untersuchungen gezeigt, ist die Stabilität von Liposomen in wässriger Dispersion begrenzt. Eine Verlängerung der Lagerfähigkeit wird durch Gefriertrocknung der liposomalen Systeme erreicht. Mit dem Zusatz eines Kryoprotektors, z.B. des Disaccharides Trehalose in der Konzentration von 1,6 g pro Gramm Phospholipid, ist eine Gefriertrocknung und spätere Rehydratation unter Erhalt der ursprünglichen Form und fast vollständigen Bewahrung des Inhalts möglich [152]. Der partielle Verlust eines inkorporierten Arzneistoffs kann wie folgt erklärt werden: Das trockene Phospholipid existiert als Gelphase. Wird es rehydratisiert, unterliegt es einem Übergang in die flüssigkristalline Phase. Durch diesen Phasenübergang und die damit verbundene Mobilisierung der Phospholipidmoleküle kommt es zu einem partiellen Verlust eines inkorporierten Arzneistoffs. Der Zusatz von Trehalose bewirkt, dass die Phospholipide auch während des Gefriertrocknungsvorgangs in der flüssig-kristallinen Phase bleiben.

Neben Trehalose kommen auch andere Zucker, wie z.B. Inulin [153], in Frage. Ebenso kann auch die kryoprotektive Wirkung der Saccharose genutzt werden.

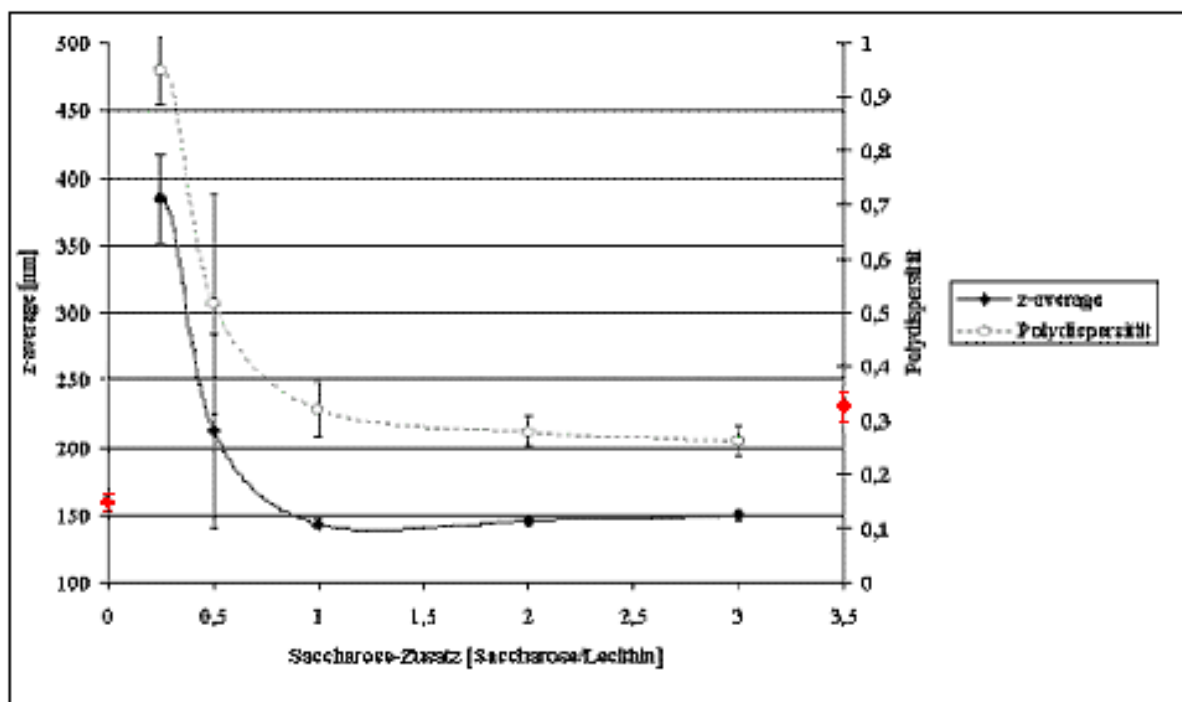


Abbildung 4.45 Veränderung von z-average und Polydispersität durch das Einfrieren. Saccharose diente als Kryoprotektor. Die verwendete Masse wurde auf die Lecithinmasse (12,3 %) bezogen. (n=3) Zur besseren Vergleichbarkeit wurden zusätzlich die Messwerte der Ausgangsliposomendispersion angegeben. Der z-average dieser auf der linken, deren Polydispersität auf der rechten y-Achse.

Um die kryoprotektive Wirkung der Saccharose zu beurteilen, wurden Liposomen-dispersionen wie unter 3.2.2.1 beschrieben hergestellt. Diese wurden mit verschiedenen Zusätzen an Saccharose gefriergetrocknet, redispergiert und die Partikelgrößen sowie Polydispersitätsindices bestimmt. Die gemessenen Partikelgrößen und deren Verteilungen wurden mit den Werten der Ausgangsliposomendispersion (●), d.h. der Liposomdispersion vor Gefrier Trocknung und Zusatz eines Kryoprotektors verglichen. Ergab sich hierbei eine nur geringe Differenz, wurde dieser positiv zu wertende Befund der kryoprotektiven Wirkung des Zusatzes zugeschrieben. Wie aus Abbildung 4.45 zu erkennen ist, zeigt die Saccharose eine kryoprotektive Wirkung, wenn sie mindestens im gleichen Anteil wie Lecithin eingesetzt wird.

Beim Einfrierprozess unter Zusatz von Saccharose, wurde bei einem Verhältnis Saccharose/Lecithin  $\leq 1$  eine Abnahme des z-averages mit zunehmenden Verhältnis Saccharose/Lecithin festgestellt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass kleine Liposomen eher stabilisiert werden können als große. Pro Saccharose-Molekül kann ein bestimmtes Volumen stabilisiert werden. Da das Volumen der Liposomen mit der Liposomgröße steigt, können kleine Liposomen eher stabilisiert werden als große.

Bei einem Verhältnis Saccharose/Lecithin  $\geq 1$  nimmt der z-averages mit zunehmenden Verhältnis Saccharose/Lecithin zu, da mit steigendem Zusatz von Saccharose immer größere Liposomen stabilisiert werden können (Abbildung 4.45).

#### **4.3.12 Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der verkapselten Lokalanästhetikamenge (Charakterisierung des Verfahrens und erste Messwerte)**

Zur Bestimmung des Beladungsgrades der Liposomen mit Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl wurde der freie, ungebundene Arzneistoffanteil photometrisch bestimmt und hieraus durch Differenzbildung auf den inkorporierten Anteil geschlossen. Dazu wurde eine Gleichgewichtsdialyse gemäß 3.2.14 durchgeführt.

Die Umverteilung des Lokalanästhetikums aus dem Dialyseschlauch in die äußere wässrige Phase kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, die daher systematisch zu untersuchen sind.

Als erstes erfolgte die Überprüfung der Dosiergenauigkeit der Eppendorff®-Pipette. Die 2 ml Vorlage wurde in zwei Schritten mit einer 1 ml fassenden Eppendorff®-Pipette aus der Liposomdispersion entnommen. Die Überprüfung ergab ein Entnahmevolumen von  $1,002 \pm 0,0015$  ml.

In einem weiteren Schritt wurde die Abgabe UV-aktiver Substanzen aus den Gefrierklammern überprüft, indem sie den Dialysierbedingungen ausgesetzt wurden. Nach 14 Stunden erfolgte die UV-photometrische Vermessung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 263$  nm.

Die Auswertung lieferte Absorptionen von etwa 0,013. Die Vermessung der lokalanästhetika-haltigen Liposomendispersionen ergab eine mind. 20fach höhere Absorption, sodass die durch die Abgabe UV-aktiver Substanzen aus den Gefrierklammern verursachte Beeinflussung des Messergebnisses vernachlässigt werden konnte.

Im Gegensatz dazu kann die Veränderung des Messergebnisses durch die Abgabe UV-aktiver Substanzen aus der Dialysemembran nicht vernachlässigt werden. Der Akzeptor wies bei der UV-photometrischen Messung nach 14 Stunden eine Absorption von 0,105 auf. Die einer 14-stündigen Dialyse unterworfenen Dialysemembran wurde dann in frisches Akzeptormedium eingebracht und eine weitere Probe des wässrigen Akzeptorkompartiments nach 6 Tagen vermessen. Die Probe wies dann eine Absorption von 0,046 auf. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden für die folgenden Untersuchungen Dialyseschläuche verwendet, die vor ihrem Einsatz mind. 24 h in Wasser gelagert wurden.

In der Literatur finden sich mehrere Artikel, die feststellen, dass Lipidemulsionen (u.a. Propofol-Emulsion) Weichmacher anlösen, die dann aus den Kunststoffteilen in die Zubereitung einwandern [154, 155]. Um die Gefahr einzuschätzen, inwieweit das Messergebnis der photometrischen Messung durch Weichmacher verändert wird, wurde 2 ml Miglyol in den Dialyseschlauch eingebracht. Da die Absorption von 0,165 nicht höher lag als die Addition der Absorption des Dialyseschlauchs und der Eigenabsorption des Miglyols, wurde ein das Ergebnis verfälschendes Herauslösen UV-spektrometrisch aktiver Weichmacher durch die Emulsion selbst ausgeschlossen.

Die herauslösbare Menge an Diethylhexylphthalat (DEHP), dem Weichmacher, der PVC am häufigsten zugesetzt wird, ist abhängig von der KMK (kritische Mizellbildungskonzentration) der Substanzen in der Emulsion (je niedriger sie ist, desto mehr DEHP wird herausgelöst) [154].

Weder Lidocain-HCl noch Prilocain-HCl zeigen die Tendenz zur Mizellbildung (siehe Kap. 4.2), daher kann ein Herauslösen des Weichmachers durch die Lokalanästhetika ebenfalls ausgeschlossen werden.

Im Unterschied zur direkten UV-photometrischen Absorptionsbestimmung ergab die Auswertung mit der Hochdruckflüssigchromatographie andere Konzentrationen der Lokalanästhetika. Um diese Differenz der Messergebnisse zu erklären, wurden die Absorptionsspektren von Lidocain-HCl und Lecithins aufgenommen (Abbildung 4.46).

Aus der Abbildung kann man Eigenabsorption des Lecithins entnehmen. Die beobachtete Differenz der Messergebnisse vor bzw. nach Passieren einer Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)-Säule kann auf diese zurückgeführt werden, da Lecithin bei der UV-photometrischen Messung miterfasst wird, während es bei der HPLC Methode vor der Detektion vom Lokalanästhetikum getrennt wird.

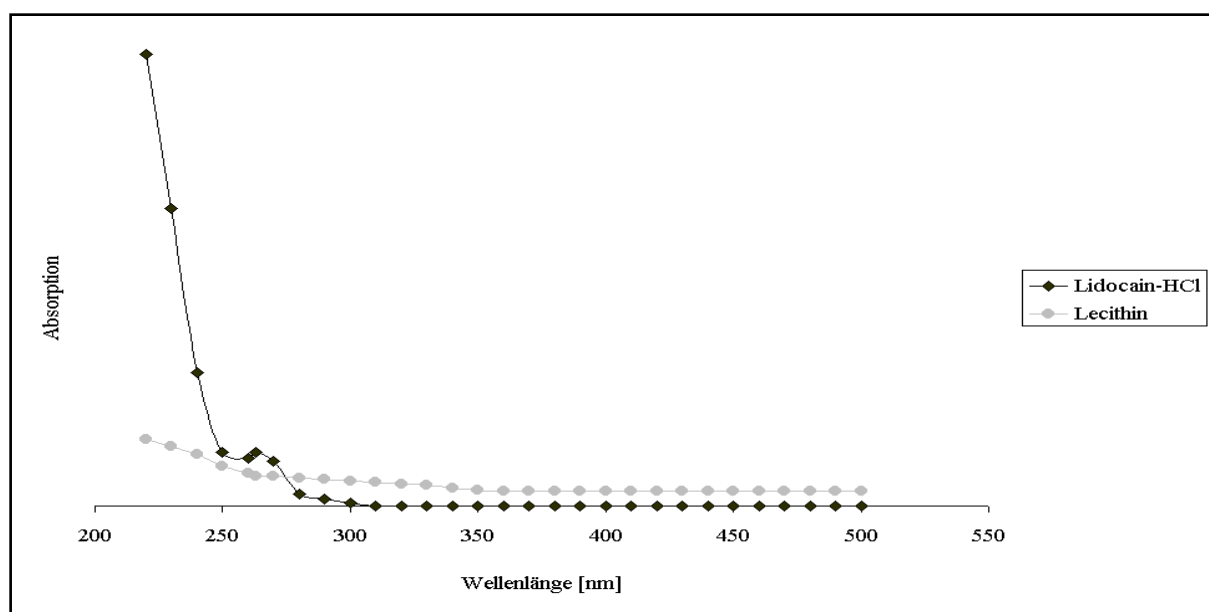


Abbildung 4.46 Absorptionsspektrum von Lidocain-HCl und Lecithin

Alle Versuche, bei der direkten UV-photometrischen Detektion Lidocain-HCl und Lecithin zu trennen, erwiesen sich aufgrund der ähnlichen Lösungseigenschaften der beiden Stoffe als nicht quantitativ durchführbar. Eine Phosphatbestimmung, die die Menge an Lecithin detektieren würde, wurde verworfen, da sie zur Verwendung als Standardmethode zu aufwendig war. Für Vergleichsuntersuchungen, bei denen die Tendenz wichtiger war als das exakte Messergebnis, wurde die schnellere UV-spektrometrische Auswertung gewählt. Bei Messungen, die exakte Ergebnisse erforderten, wurde die UV-photometrische Detektion nach Passieren einer HPLC-Säule genutzt.

In Abbildung 4.47 ist zu erkennen, dass der Verzicht auf das Eisbad auch hier, wie bei der Partikelgröße, nur einen geringen Einfluss hat. Des Weiteren wird aus der Darstellung ersichtlich, dass der Austausch von Wasser als Akzeptormedium durch Phosphatpuffer (pH-Wert = 7,4) des EuAB keinen Einfluss auf die dialysierte Menge an Lidocain-HCl hat.

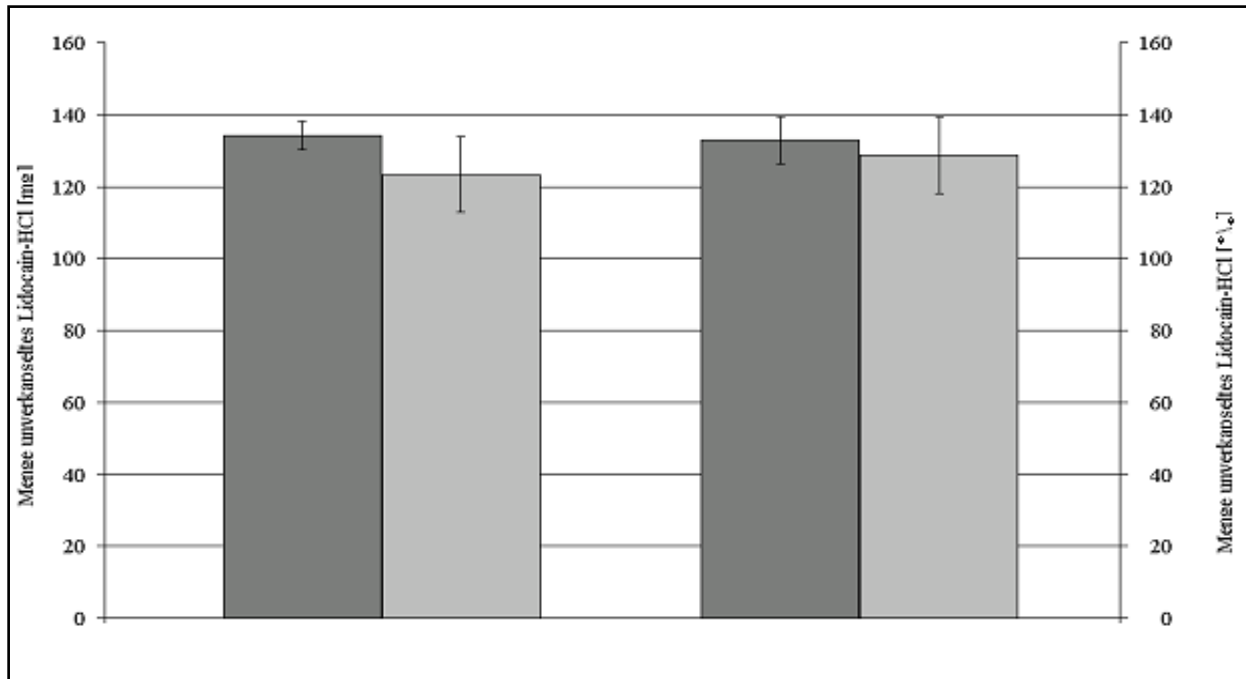


Abbildung 4.47 Die unverkapselte Menge an Lidocain-HCl nach 14 h. Die Herstellung erfolgte mittels Ultraschall (in 15 Zyklen jeweils 60 s Energieeintrag und 60 s Pause unter Eiskühlung (Säule 1+3) bzw. in 30 Zyklen jeweils 30 s Energieeintrag und 80 s Pause (Säule 2+4). Als Akzeptor diente Wasser (Säule 1+2) bzw. Puffer pH-Wert = 7,4 (Säule 3+4). Die Detektion erfolgte UV-photometrisch bei  $\lambda = 263 \text{ nm}$ . (n=4)

Da nur die Tendenz, ob die Verwendung von Phosphatpuffer (pH-Wert = 7,4) des EuAB anstatt Wasser als Akzeptormedium zur Veränderung der UV-photometrisch detektierbaren Substanzen führt, wurde hier keine Bestimmung mit der HPLC durchgeführt. So ist auch eine UV-Absorption zu erklären, deren Werte eine Menge an Lokalanästhetikum vortäuschen, die die eingesetzte Menge übersteigt.

Die Zugabe der Lokalanästhetika nach der Bildung der SUVs führte zu keiner Verkapselung. 100 % des eingesetzten Arzneistoffs war im Dialyserversuch nachweisbar (Abbildung 4.48).

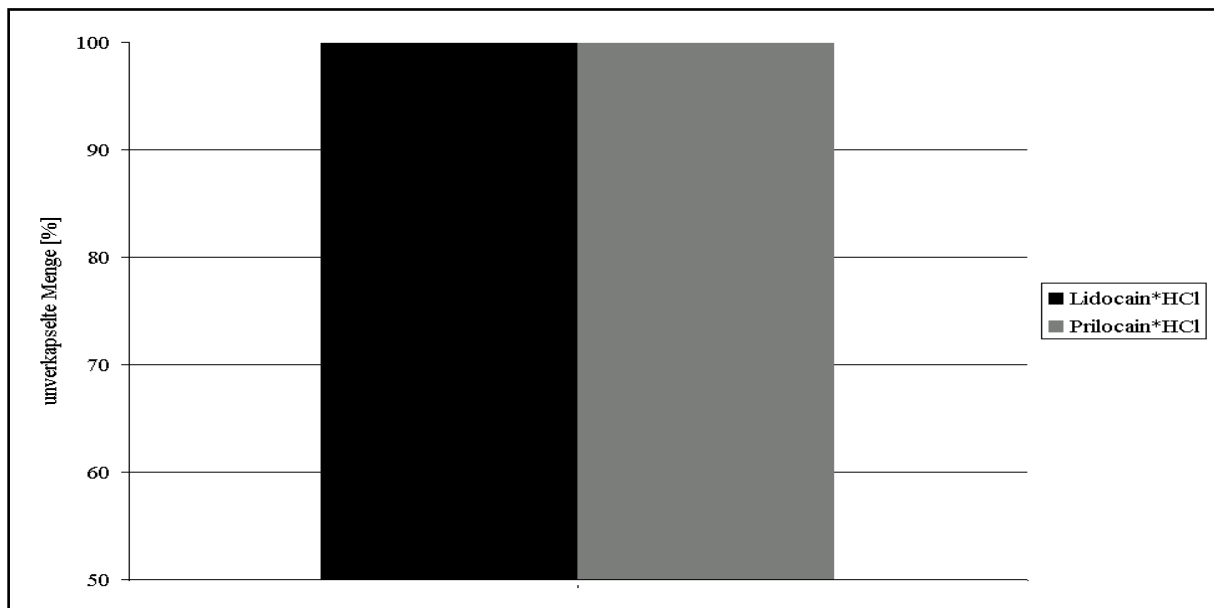


Abbildung 4.48 Unverkapselte Menge an Lidocain-HCl und Prilocain-HCl nach Zugabe nach der Bildung der SUVs. Bestimmt mittels HPLC.

## 4.4 Erhöhung der Arzneistoffmenge pro Probenvolumen

### 4.4.1 Testung alternativer Methoden zur Herstellung arzneistoffbeladener Liposomen

Obwohl die direkt UV-spektralphotometrisch ausgewerteten Dialyserversuche (Abbildung 4.47) eine Quantifizierung der verkapselten Arzneistoffmenge noch nicht zuließen, sollte parallel zur Änderung der Detektionsmethode getestet werden, ob eine andere Art der Vordispersierung bei der Liposomenherstellung zu einer verbesserten Arzneistoffbeladung führt. Hierzu wurden die Polyolverdünnungsmethode und die Filmbildungsmethode eingesetzt [156].

Bei der Polyolverdünnungsmethode wurde das Lecithin in der gleichen Menge Propylenglykol von 55 °C gelöst. Die Arzneistofflösung wurde ebenfalls auf etwa 55 °C erwärmt und mit der Propylenglykollösung vereinigt, sodass die Endkonzentration an Propylenglykol und Lecithin bei 3 % und die Endkonzentration an Lokalanästhetikum bei 5 % lag. Die Mischung wurde für mehr als 5 min (10000 U/min) bei 55 °C mit dem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, D-Staufen) homogenisiert [156].

Die Filmbildungsmethode sieht zur Oberflächenvergrößerung vor, dass das Lecithin in einem organischen Lösungsmittel gelöst und das Lösungsmittel anschließend abgezogen wird. Das Lecithin wurde dazu in einem Rundkolben in der entsprechenden Menge Ethanol gelöst. Im Anschluss wurde das Ethanol am Rotavapor abgezogen. Der so entstandene Film wurde nach 24 h in Wasser bzw. der entsprechenden Lokalanästhetika-Lösung dispergiert.

Für eine intravenöse Applikation sind nur wenige Substanzen und Lösungsmittel, u.a. Ethanol, zugelassen. Bei Verwendung eines Lösungsmittels, das nicht für die intravenöse Applikation zugelassen ist, würde sich an die Herstellung eine Abtrennung des Lösungsmittels und der Nachweis der rückstandsdsfreien Abtrennung anschließen. Um dieses zu vermeiden, wurde Ethanol als Lösungsmittel benutzt.

Beide Verfahren lieferten sowohl hinsichtlich der Teilchengröße, als auch hinsichtlich des Beladungsgrad gegenüber der Dispergierung mit dem Magnetrührer keinen Vorteil und wurden daher nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurde untersucht, ob ein Wechsel der Herstellungsmethode einen positiven Einfluss hat. Als alternatives Herstellungsverfahren wurde die FDEL (Freeze-Dried Empty Liposomes)-Methode gewählt.

Dazu wurden Liposomen, wie unter 3.2.1 beschrieben, hergestellt. Nach der Behandlung mit Ultraschall wurden diese unter Zusatz eines Kryoprotektors im Gefriertrockner bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  über mindestens eine Woche tiefgefroren. Anschließend wurde die lyophilisierte Liposomen-dispersion durch den Zusatz von Aqua bidest. bzw. 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung rehydratisiert. Von Jizomoto und Hirano wurde nämlich festgestellt, dass das eingeschlossene Volumen der rehydratisierten Liposomen höher ist, wenn das Rehydratisierungsmedium eine gewisse Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aufweist [157]. Zur Redispergierung bzw. Rehydratisierung wurde die Probe leicht geschüttelt. Die Probe wurde dann bei Raumtemperatur gelagert bzw. für 10 min in einem Wasserbad von etwa  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Auch die Inkubation über bzw. unter der Übergangstemperatur soll einen positiven Effekt auf das Einschlussvolumen haben [158]. Das Lokalanästhetikum wurde entweder der wässrigen Phase vor der Herstellung der Liposomdispersion, oder der Rehydratationslösung zugesetzt.

Weder die Verwendung der unterschiedlichen Rehydratisierungslösungen noch die Rehydratisierung bei unterschiedlichen Temperaturen noch die Veränderung des Zeitpunkts der Zugabe des Lokalanästhetikums, führten zu einem höherem Beladungsgrad verglichen mit der bisher verwendeten Methode.



---

Neben der Änderung der Herstellungsweise kann man noch folgende weitere Ansätze verfolgen, um eine höhere Konzentration an Arzneistoff zu erreichen:

1.) Erhöhung der Anzahl an Liposomen pro ml

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die zugesetzte Lecithinmenge erhöht. Die maximale Konzentration an Lecithin, die verarbeitbar ist, beträgt 0,7 g zu 5 ml Wasser (12,3 (g/100g)). Bei höheren Konzentrationen wird die Probe entweder direkt oder beim Behandeln mit Ultraschall zu viskos. Eine Dosierung wäre dann ungenau.

Für eine Lecithinkonzentration von 12,3 % betrug die Dispergierzeit etwa 24 h.

2.) Erhöhung der Größe der Liposomen

Aus Abbildung 2.16 folgt, dass das Einschlussvolumen eine deutliche Korrelation mit dem Partikeldurchmesser aufweist, d.h. mit zunehmendem Durchmesser der Liposomen steigt die eingeschlossene Menge des Arzneistoffs.

Einer bimodalen Verteilung liegen zwei Fraktionen zu Grunde. Es sollte die Beschallungszeit ermittelt werden, bei der diese beiden Fraktionen möglichst klar voneinander getrennt sind, sodass der Anteil der höheren Partikelgrößen abfiltriert werden kann (Abbildung 4.49). Da sich an die Probenherstellung sowieso eine Filtration anschließt (Kapitel 2.4), um eine enge Verteilung zu erreichen, wird hierdurch kein zusätzlicher Herstellungsschritt nötig. Da der benutzte Polycarbonat-Filter eine Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  aufwies, sollte eine der beiden Fraktionen unter 400 nm groß sein. Dazu wurde nun die Zyklenanzahl der Ultraschallbehandlung ermittelt, bei der eine bimodale Verteilung in der Form resultiert, dass die erste Fraktion Partikeldurchmesser bis 400 nm, die zweite Fraktion Partikeldurchmesser über 400 nm aufweist (Abbildung 4.50). Hierzu erwies sich die Anwendung von 32 Zyklen, jeweils mit 15 s Energieeintrag und 95 s Pause, als beste Lösung.

3.) Erhöhung der Beladungseffizienz

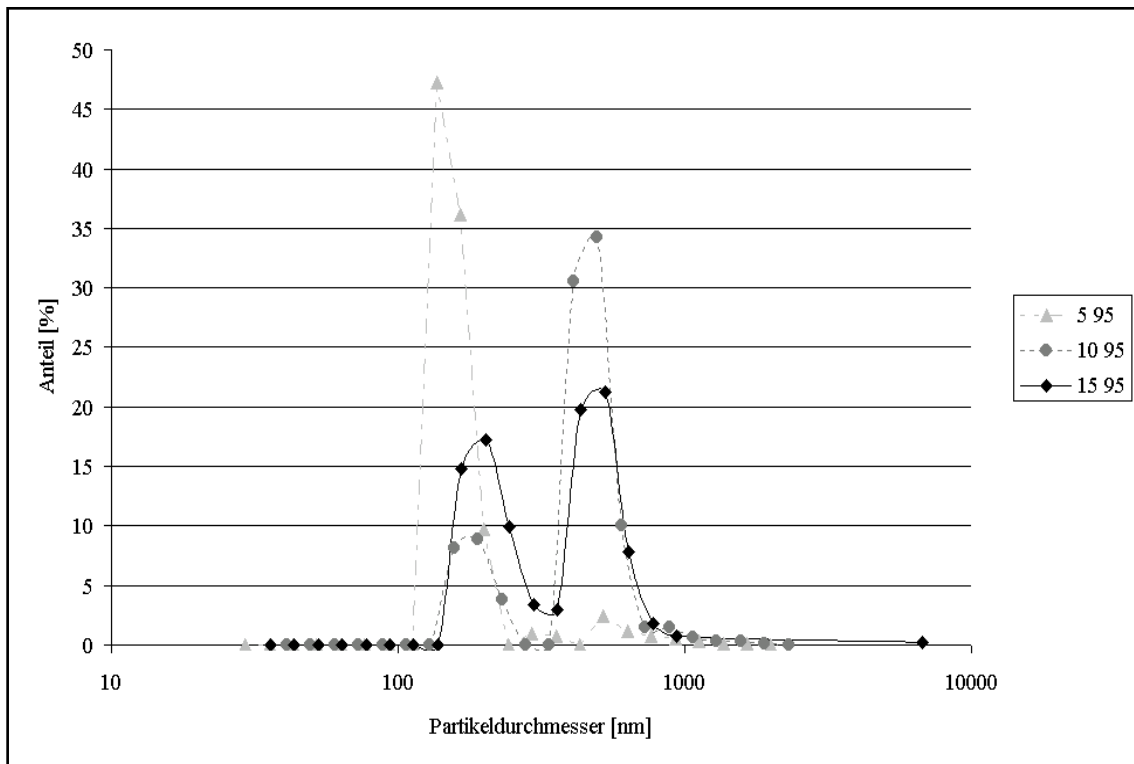


Abbildung 4.49 Die Verteilung der Partikeldurchmesser, abhängig von den Sekunden des Energieeintrags (1. Zahl der Legende) und der Pause (2. Zahl der Legende) pro Zyklus (für diese Darstellung wurde der Zyklus 10 mal wiederholt)

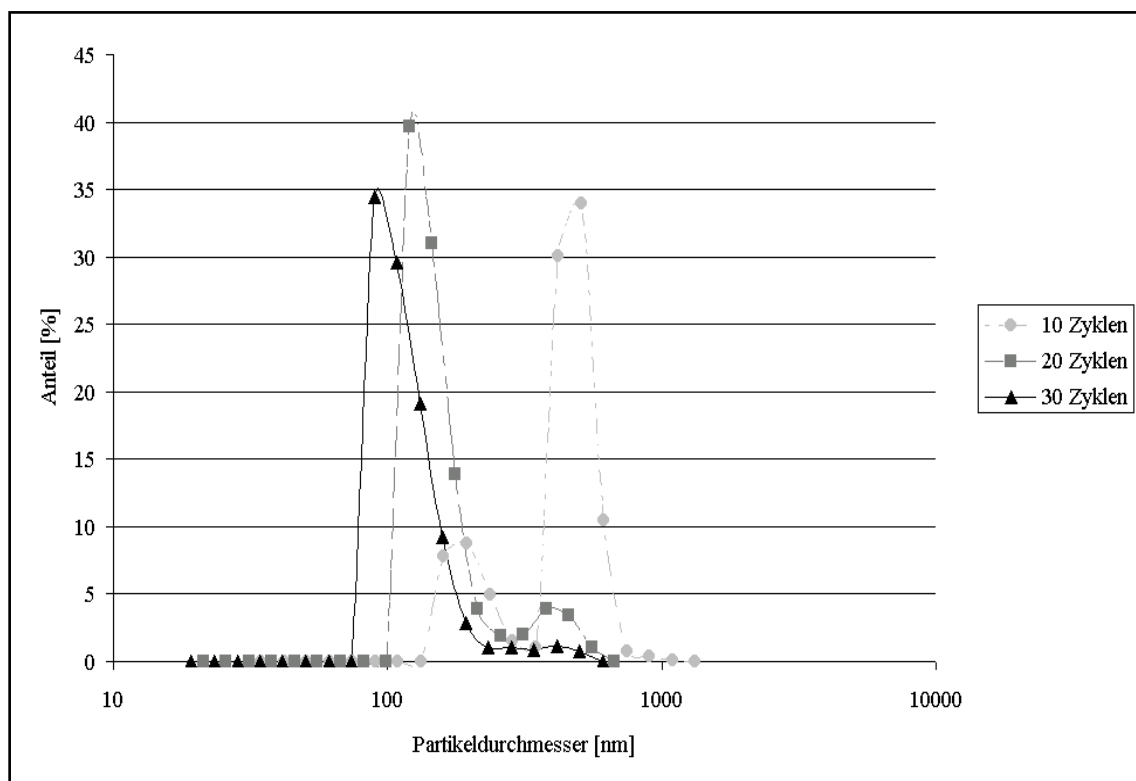


Abbildung 4.50 Die Verteilung der Partikeldurchmesser abhängig von der Anzahl der Zyklen. Der Zyklus bestand aus 15 s Energieeintrag und 95 s Pause

Die Beladung mit hydrophilen Substanzen ist, wie zahlreiche Untersuchungen zeigen, sehr schwierig. Daher sind verschiedene Methoden verwendet worden, um eine möglichst effiziente Beladung zu erreichen: Die Bildung von Ionenpaaren [159], Komplexen [160], Verwendung eines  $\text{NH}_4^+$ - [161] bzw. eines pH-Gradienten [162].

Eine häufig genutzte Methode, um die Verkapselung eines polaren also wenig hydrophoben Arzneistoffes zu erhöhen, ist, ihn in eine hydrophobere Form zu überführen [163]. Darauf beruhend sollten Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl, die beide einen  $\text{pK}_a$ -Wert von 7,9 zeigen, durch Verschieben des pH-Werts in den alkalischen Bereich in die stärker hydrophoben Basen überführt werden.

Hierzu erfolgte die Herstellung unter neutralem pH-Wert, der mit einer NaOH-Lösung eingestellt wurde.

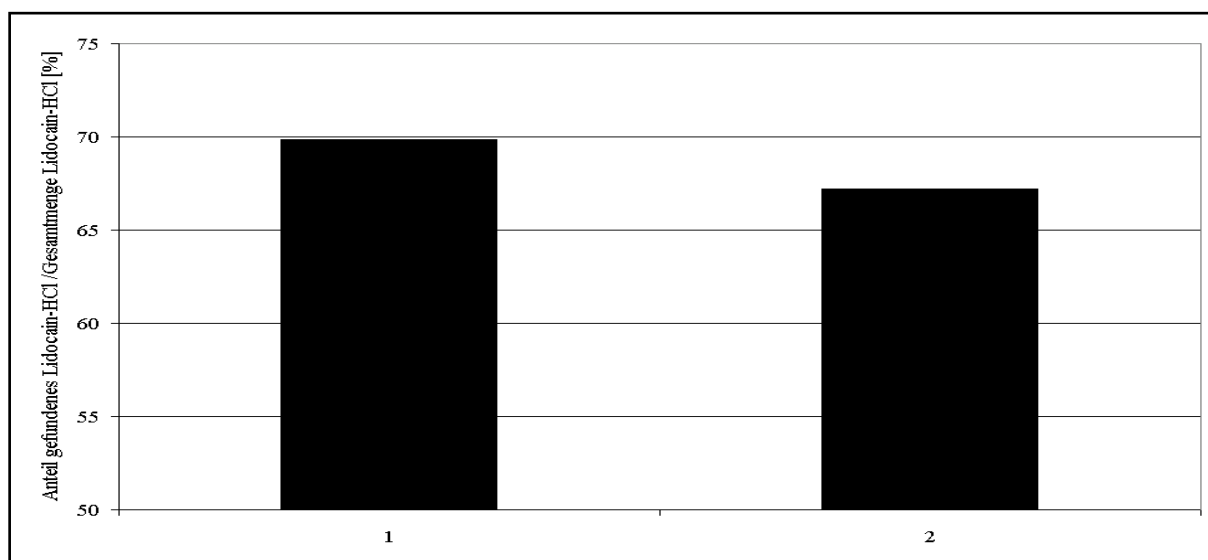


Abbildung 4.51 Freie Menge an Lidocain-HCl nach 14 h Gleichgewichtsdialyse gemäß 3.2.14 neutralisierte (2) bzw. nicht neutralisierte (1) Probe. Die Probe enthielt 12,3 % Lecithin und 5 % Lidocain-HCl. Die Beschallung erfolgte in 32 Zyklen (jeweils 15 s Energieeintrag und 95 s Pause). Die Auswertung erfolgte mittels HPLC (n=1).

Abbildung 4.51 zeigt, dass von einer 12,3 % Lecithin enthaltenden Liposomendispersion ca. 30 % des eingearbeiteten Lidocain-HCl inkorporiert werden, während nach Neutralisierung ca. 33 % des Lokalanästhetikums verkapselt werden. Die Einschlusseffizienz scheint also bei einer Neutralisation besser zu sein (Abbildung 4.51). Da die Lidocainbase in Wasser unlöslich ist, könnte ihre Ausfällung das Dialysierverhalten beeinflussen. Um dieses ausschließen zu können, wurde deshalb reiner Ethanol als Dispergierungsmedium gewählt, da in diesem sowohl die Base als auch das Hydrochlorid löslich ist. Hier wurde dann durch Zusatz von ethanolischer NaOH neutralisiert (Abbildung 4.52).

Sowohl Abbildung 4.51 als auch 4.52 zeigen, dass die freivorliegende Menge an Lidocain-HCl durch die Anhebung des pH-Werts verkleinert wird. Dieses Phänomen wird sogar deutlicher, wenn man Wasser als flüssige Komponente durch Ethanol austauscht. Es ist somit wahrscheinlich auf die beschriebene bessere Verkapselung hydrophoberer Wirkstoffe zurückzuführen.

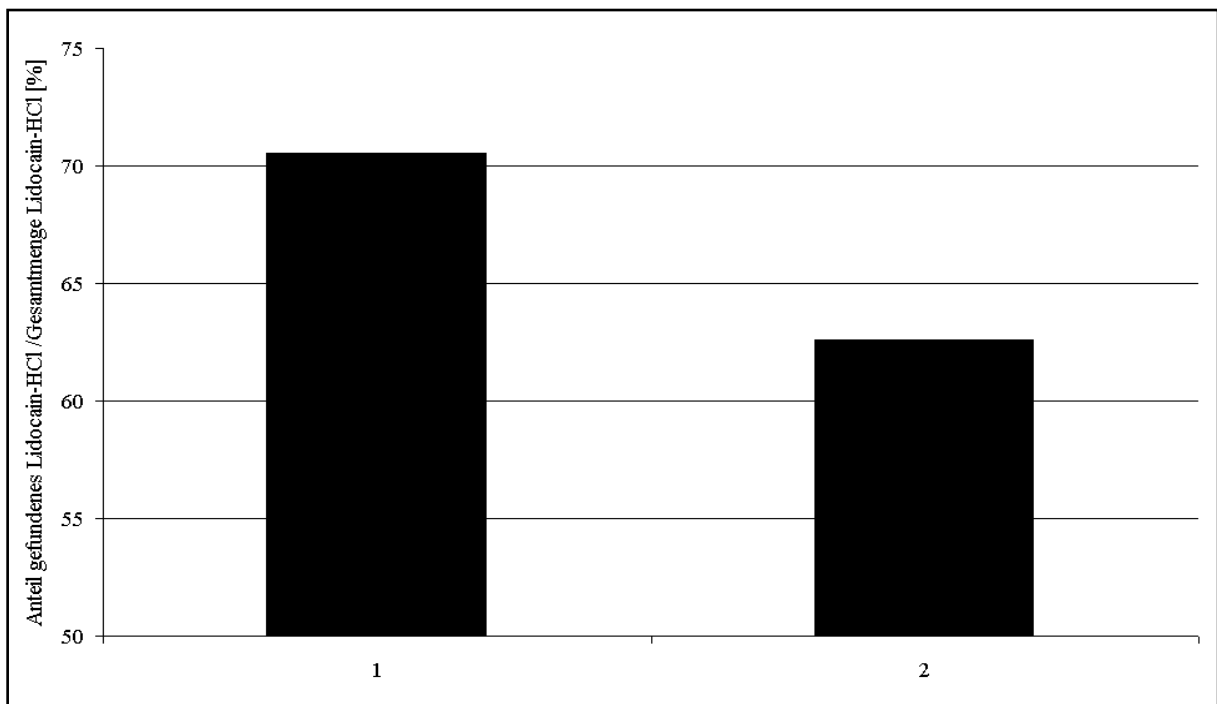


Abbildung 4.52 Freie Menge an Lidocain-HCl nach 14 h Gleichgewichtsdialyse gemäß 3.2.14 (Variation: Ersatz des Wassers durch Ethanol) neutralisierte (2) bzw. nicht neutralisierte (1) Probe. Die Probe enthielt 12,3 % Lecithin und 5 % Lidocain-HCl. Die Beschallung erfolgte in 32 Zyklen (jeweils 15 s Energieeintrag und 95 s Pause). Die Auswertung erfolgte mittels HPLC.

#### 4.4.2 Lagerungsstabilität

Abschließend sollte die Lagerstabilität der beiden Liposomdispersionen (mit 3 % bzw. 12,3 % Lecithin) verglichen werden. Hierzu wurden die Proben unter Berücksichtigung der in den vorherigen Untersuchungen ermittelten Parameter hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden daraus geringe Anteile genommen und deren z-average und Polydispersität ermittelt.

Während die Liposomen, die mit einem Anteil von 12,3 % Lecithin hergestellt wurden, nicht zur Agglomeration neigen, neigen die Vesikel, die mit einem Anteil 3 % Lecithin hergestellt wurden, zum Agglomerieren (Abbildung 4.53 und 4.54). Dass es sich bei den größeren Partikeln der Liposomendispersionen mit 3 % Lecithin um Agglomerate (keine Aggregate) handelt, erkennt man daran, dass sie durch Behandlung im Ultraschallbad wieder in Einzelpartikel getrennt werden können (Abbildung 4.55).

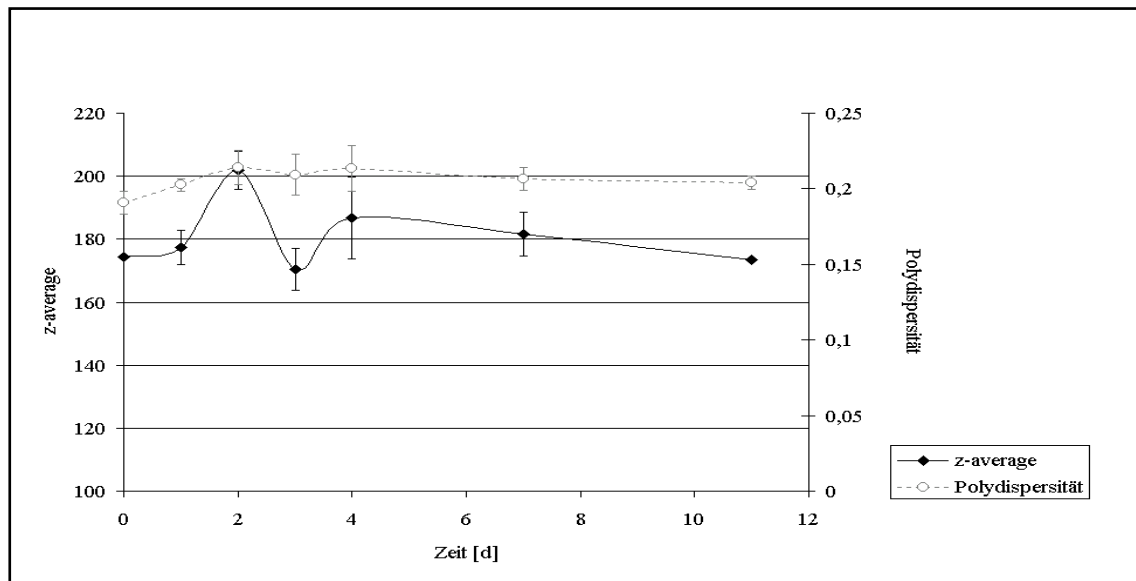


Abbildung 4.53 Polydispersität und z-average arzneistofffreier Liposomen in Abhängigkeit von der Lagerzeit. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Proben enthielten 12,3 % Lecithin. (n=3)

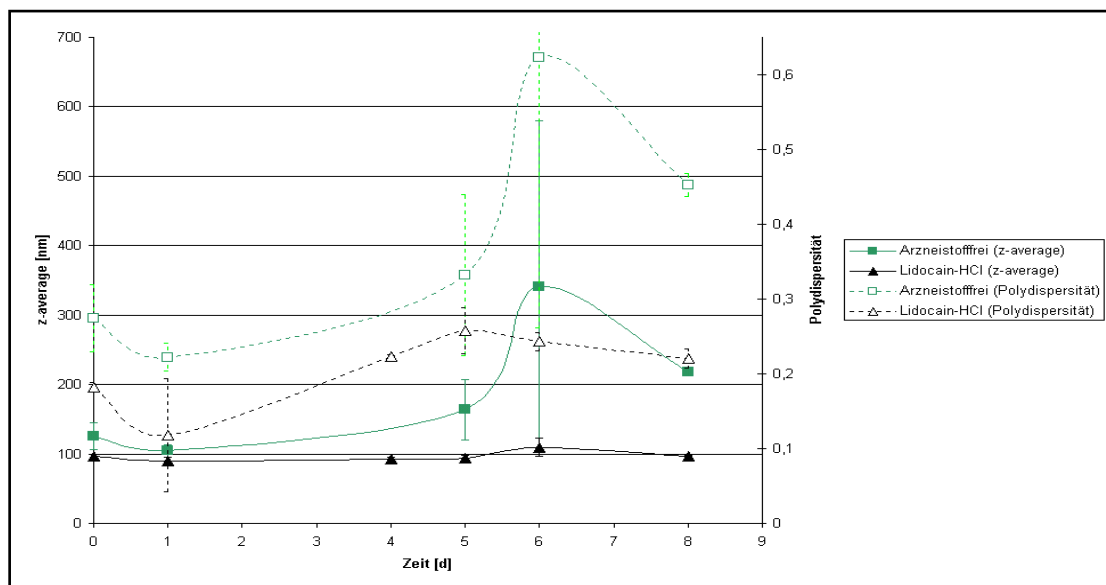


Abbildung 4.54 Polydispersität und z-average Lidocain-HCl haltiger bzw. arzneistofffreier Liposomen in Abhängigkeit von der Lagerzeit. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Proben enthielten 3 % Lecithin. (n=3)

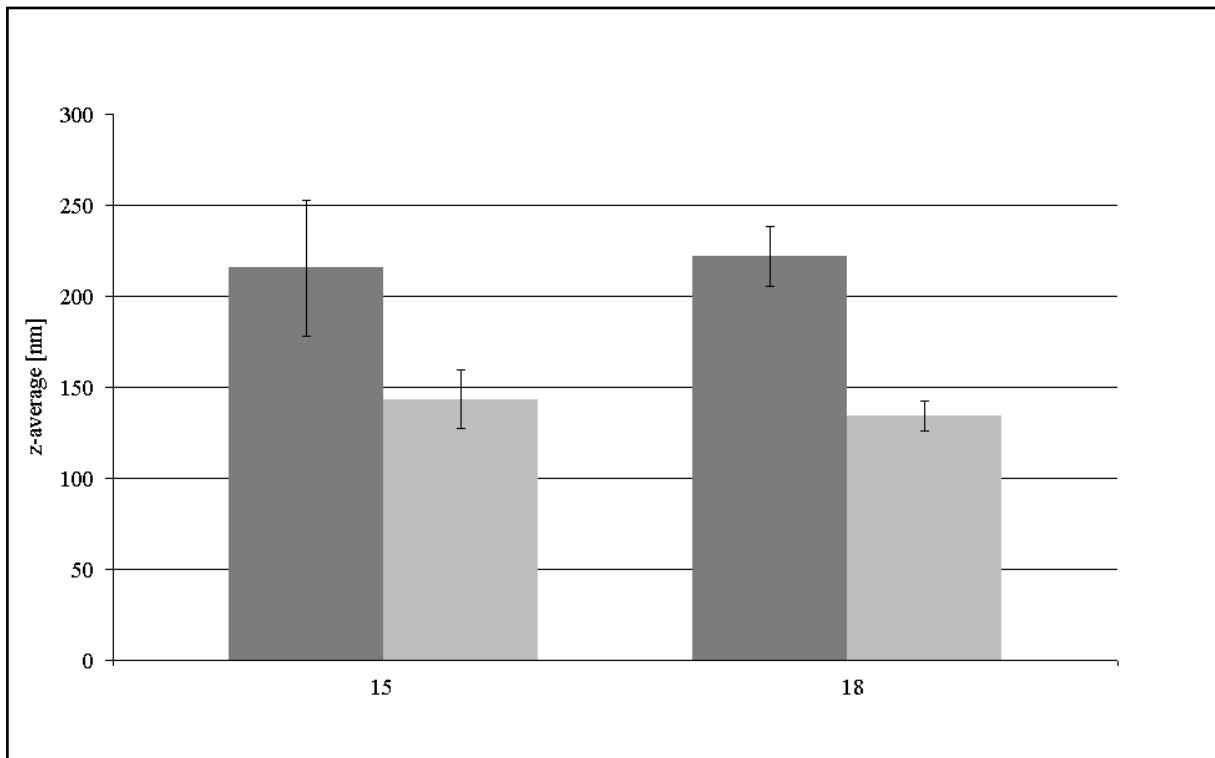


Abbildung 4.55 Z-average von arzneistofffreien Liposomen, mit 3 % Lecithin, am 15. bzw. 18. Tag der Lagerung bei Raumtemperatur, direkt (linke Säule) und diese nach 10 minütiger Behandlung im Ultraschallbad (rechte Säule). (n=3)

Die Untersuchung zeigte, dass trotz höherer Partikelgröße der Liposomen mit 12,3 % Lecithin (Abbildung 4.53) eine weitere Teilchengrößenzunahme verhindert wird. Weiterhin verhindert auch die Beladung der Liposomen mit Lokalanästhetika (Abbildung 4.54) deren Agglomeration.

In der folgenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob eine Änderung der elektrischen Ladung der Oberfläche die unterschiedlichen Partikelgrößen nach der Lagerung bewirkt.

Dazu wurde das Zetapotentials der verschiedenen Zubereitungen bestimmt.

Nach den negativen Erfahrungen bei der ersten Messung (Kap. 4.3.8) wurde das Zetapotential von Proben nach Abdiffundieren unverkapselter Lokalanästhetikamoleküle bestimmt. Das Zetapotential der mit dem Lokalanästhetikum beladenen Liposomen unterscheidet sich leicht (Abbildung 4.56 b, Säule 2 und 3) von dem unbeladenen Liposomen (Abbildung 4.56 b, Säule 1). Die Differenz des Zetapotentials ist aber zu gering, um eine Stabilisierung zu bewirken.

Nach Siekmann und Westesen [164] ist nämlich für eine Stabilisierung ein Zetapotential von mind.  $-20$  mV nötig. Dieses wird in Gegenwart des Lokalanästhetikums nicht nur nicht erreicht, sondern stark abgeschwächt.

Die beobachtete Abnahme der Fusionsneigung lokalanästhetikahaltiger Liposomdispersionen kann somit nicht mit einer Veränderung der Oberflächenladung in Verbindung gebracht werden.

Da sich das Zetapotential des arzneistofffreien Systems mit 12,3 % Lecithin nicht deutlich von dem des arzneistofffreien Systems mit 3 % Lecithin unterscheidet (Abbildung 4.56 a), beruht die geringere Agglomerationsneigung wahrscheinlich nicht auf einer unterschiedlichen Oberflächenladung der Liposomen, sondern auf einer durch die geringere Wandspannung verminderten Fusionsneigung. Die Fusionsneigung ist von der Größe der Partikel abhängig und bei abnehmender Partikelgröße stärker ausgeprägt.

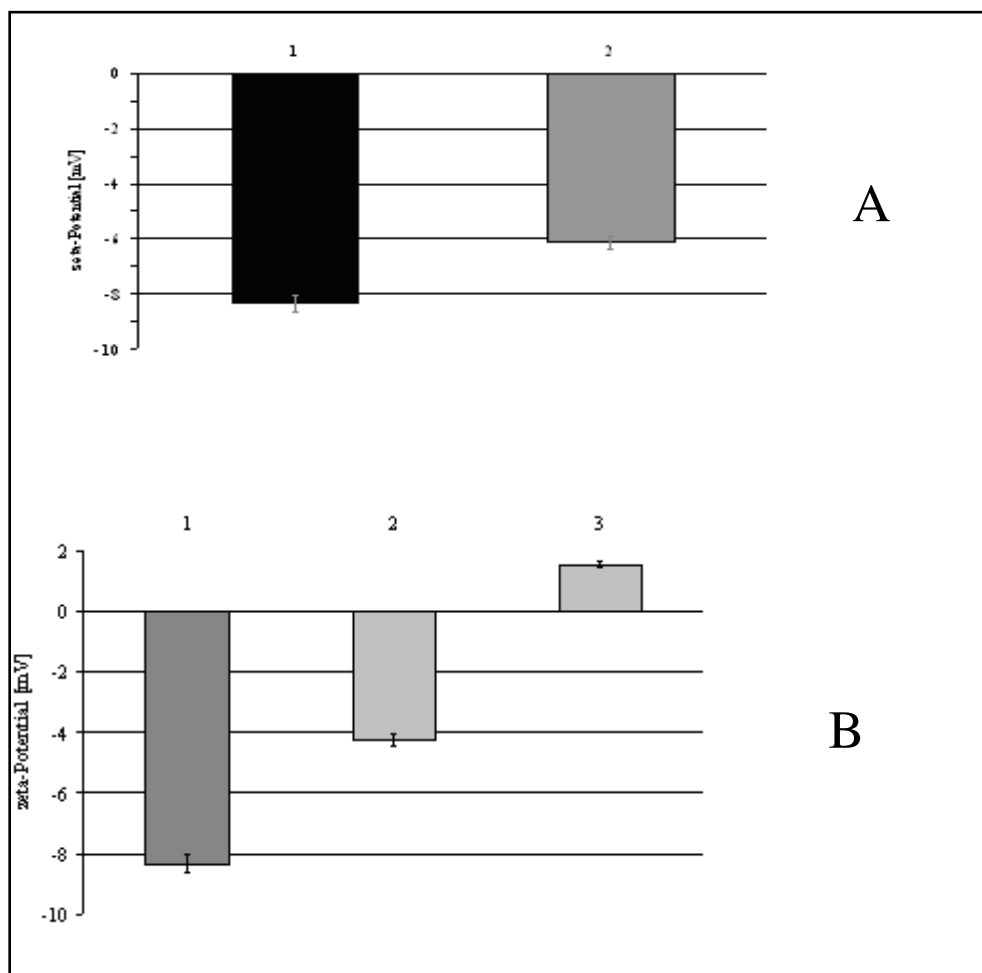


Abbildung 4.56 Zetapotential von a) arzneistofffreien Liposomen mit 3 % Lecithin (1) und 12,3 % Lecithin (2); b) arzneistofffrei (1), mit 5 % Lidocain-HCl (2), mit 5 % Prilocain-HCl (3); jeweils mit 3 % Lecithin

## 5. Zusammenfassung

Aufgrund der Anfrage eines Krankenhausapothekers wurde in früheren Untersuchungen von Kaufke und Krauel [12] die Stabilität einer Mischung aus Lokalanästhetikallösung und Propofol-Emulsion untersucht und dabei festgestellt, dass der Austausch des in der Packungsbeilage empfohlenen Lokalanästhetikums Lidocain durch das ebenfalls zum Amid-Typ gehörige Lokalanästhetikum Prilocain zum Brechen der Emulsion führte, welches durch Anwachsen der Öltröpfchen und Aufräumung der Fettphase erkennbar war.

Als Grund für diesen Befund wurde von Krauel und Kaufke die Wechselwirkung des Lokalanästhetikums mit dem Emulgator der Fettemulsion angenommen. Zwar konnte die Interaktion zwischen Lecithin und Prilocain-HCl, die von Kaufke und Krauel [12] beobachtet worden war, in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden, bildete jedoch die Motivation für den Ansatz Lokalanästhetikum und emulgierte Tröpfchen räumlich zu trennen. Dazu sollten die Lokalanästhetika in Liposomen verpackt werden.

Für die Herstellung liposomaler Dispersionen wurde der Energieeintrag mittels Ultraschall gewählt und die Bedingungen zur Herstellung intravenös applizierbarer Liposomendispersionen optimiert. Hierbei wurde besonderer Wert auf einen kleinen Partikeldurchmesser und eine enge Partikelgrößenverteilung gelegt. Dieses wurde am Besten von einer Liposomendispersionen mit 3 % Lecithin erfüllt, wobei der Energieeintrag mittels Ultraschall in 30 Zyklen (jeweils 30 s Energieeintrag und 80 s Pause) am geeignetsten war. Die dabei gebildeten Liposomen zeigten eine Partikelgröße von etwa 120 nm.

In einem weiteren Schritt sollten die Liposomen mit Lokalanästhetikum beladen werden. Zur Beladung erwies sich ein Lokalanästhetikazusatz von 5 % als optimal. Die Partikelgröße der mit Lokalanästhetikum beladenen Liposomen war geringer als die der unbeladenen und lag bei etwa 100 nm.

Zwischenzeitlich aufgetretene Schwierigkeiten bei der Liposomherstellung mit Prilocain-HCl deuteten auf Unverträglichkeiten hin, die jedoch nicht generell zwischen Lecithin und Prilocain-HCl auftraten, sondern nur bei bestimmten Chargen des Lecithins. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lecithinchargen dürfte der Unverträglichkeit mit Prilocain-HCl als Ursache zugrunde liegen.



---

Obwohl die eingeschlossene Menge an Lokalanästhetikum durch eine schrittweise Neutralisation des eingebrachten Hydrochlorids geringfügig erhöht werden konnte, erwies sich die Beladung insgesamt als gering. Um diese zu vergrößern, kann man entweder die Beladungseffizienz erhöhen, und/oder das Einschlußvolumen der Liposomdispersion vergrößern.

Für die Verbesserung der Beladungseffizienz wurde ein Wechsel des Dispersionsmediums genutzt. Der Gebrauch von Ethanol anstelle von Wasser als Dispersionsmittel erhöhte die Beladungseffizienz nur gering.

Größere Partikel und folglich ein höheres Einschlussvolumen erhielt man bei der Verwendung von 12,3 % Lecithin. Der Partikeldurchmesser lag hier bei etwa 180 nm. Die Herstellung dieser Systeme erfolgte mit einer Ultraschallbehandlung von 32 Zyklen (jeweils 15 s Energieeintrag und 95 s Pause).

Eine weitergehende Charakterisierung der erhaltenen Liposomen in Bezug auf ihre Struktur erlaubt Rückschlüsse auf ein unterschiedliches Verhalten in vitro und in vivo [165].

Daher wurde eine Vielzahl geeigneter Methoden wie Fluoreszenzmessungen, NMR- und SAXS-Messungen zur Charakterisierung eingesetzt. Die Ergebnisse deuten auf eine zwar unterschiedlich starke, aber der Art nach gleiche Wechselwirkung zwischen Lecithin und Lidocain-HCl bzw. Prilocain-HCl hin, wobei eine Lokalisation des Lokalanästhetikums im polaren Teil der Liposomen erfolgt, und zwar zwischen der polaren Kopfgruppe, hier genauer der Phosphatgruppe, des Lecithins und dem kationischen Teil des Lokalanästhetikums.

Eine Positionierung im polaren Teil der Liposomen in der Nähe der polaren Kopfgruppe ist auch für andere Lokalanästhetika, z.B. Tetracain-HCl, beobachtet worden [166].

Die Größenabnahme der beladenen gegenüber den arzneistofffreien Liposomen wird dadurch erklärbar, dass die mit Lokalanästhetikum beladenen Liposomen überwiegend unilamellar sind, wohingegen die arzneistofffreien Liposomen überwiegend oligolamellar sind. Dieses Ergebnis ergibt sich aus Röntgenkleinwinkelstreuungs-Messungen (SAXS).

---

## 6. Ansätze der Vermeidung des Injektionsschmerzes einer Propofol-Emulsion

Die Injektionsnarkose unter Verwendung von Propofol-Emulsionen ist mit einem Injektionsschmerz verbunden (Kapitel 1). Zu dessen Vermeidung sind unterschiedliche Maßnahmen getestet worden. Dabei erwies sich der Einsatz von Lokalanästhetika als beste Variante. Die Verwendung von Prilocain-HCl anstatt von Lidocain-HCl deutete jedoch auf eine Inkompatibilität zwischen Phosphatidylcholin und Prilocain-HCl hin, die Chargen-abhängig aufzutreten schien.

Um diese Inkompatibilität sicher zu vermeiden, können Prilocain-HCl und Propofol-Emulsion voneinander getrennt werden, indem das Lokalanästhetikum in Liposomen inkorporiert wird. Liposomen sind ein Trägersystem, das schon häufig für die intravenöse Anwendung genutzt wurde. Allerdings war die in dieser Arbeit erreichte verkapselte Lokalanästhetikamenge gering.

Aussichtsreiche weitere Ansätze basieren auf Untersuchungen von Eriksson et al. [46], die die Verminderung des Injektionsschmerzes der Propofol-Emulsion durch Zusatz von Lidocain-HCl auf eine pH-Wert Erniedrigung durch das Hydrochlorid zurückführen. Durch die pH-Wert Erniedrigung verringert sich die Konzentration an Propofol in der wässrigen Phase. Die Emulsion bleibt auch bei pH-Absenkung stabil, während die Addition von Lidocain-HCl in Abhängigkeit von der Einwirkzeit zu einer Destabilisierung der Propofol-Emulsion führt.

Daher sind sie der Meinung, dass zur Verminderung des Injektionsschmerzes der Propofol-Emulsion eine pH-Wertabsenkung ausreicht und der Zusatz der Lokalanästhetikabase unnötig ist.

Ein weiterer Ansatz den Injektionsschmerz zu vermeiden könnte die Verwendung besser wasserlöslicher Derivate des Propofols sein [z.B. 167]. Das Propofol muss aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in Form einer O/W-Emulsion verabreicht werden. Der Kontakt des Propofols mit den Wänden der Blutgefäße führt dann zu dem beobachtenden Injektionsschmerz. Dieser wird durch Verwendung besser wasserlöslicher Varianten des Propofols vermieden. Allerdings darf die Lipophilie des Arzneistoffes nicht so weit abnehmen, dass die ZNS-Wirkung in Frage gestellt wird.

---

Schließlich wurde von Nakane und Iwama der Einsatz des synthetischen Serininhibitor Nafamostatmesilat, der bereits als Kallikrein-Inhibitor eingesetzt wird, untersucht [50].

Das Propofol bewirkt nämlich neben der direkten Schmerzentwicklung auch eine verzögerte Schmerzentwicklung über die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems. Die mit Nafamostatmesilat erreichte Linderung des Propofolinjektionsschmerzes entsprach der von Lidocain-HCl, wobei das Nafamostatmesilat aber im Vergleich zu Lidocain-HCl etwa 20 mal billiger ist.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Aun C.S.T., New i.v. agents, Br. J. Anesth. 83, S.29-41 (1999)
- [2] Sadler P.J., Thompson H.M., Maslowski P., Liddle A., Rowbotham D.J.,  
Iontophoretically applied lidocaine reduces pain on propofol injection, Br. J. Anaesth.  
82, S.432-434 (1999)
- [3] Picard P., Tramer M.R., Prevention of pain on injection with propofol: A quantitative  
systemic review, Anesth. Analg. 90, S.963-969 (2000)
- [4] Eriksson M., Prilocaine reduces injection pain caused by propofol, Acta Anaesthesiol.  
Scand. 39(2), S.210-213 (1995)
- [5] Nathanson M.H., Gajraj N.M., Rusell J.A., Prevention of pain on injection of propofol:  
a comparison of lidocaine with alfentanil, Anesth. Analg. 82(3), S.469-471 (1996)
- [6] O'Hara J.R., Sprung J., Laseter J.T., Maurer W.G., Carpenter T., Beven M., Mascha  
E., Effects of topical nitroglycerin and intravenous lidocaine on propofol-induced pain  
on injection, Anesth. Analg. 84(4), S.865-869 (1997)
- [7] Eriksson M., Engleson S., Niklasson F., Hartvig P., Effect of lignocaine and pH on  
propofol-induced pain, Br. J. Anaesth. 78, S.502-506 (1997)
- [8] Eriksson M., Engleson S., Horte I., Hartvig P., The anaesthetic potency of propofol in  
the rat is reduced by simultaneous intravenous administration of lignocaine, Eur. J.  
Anaesthesiol. 16(5), S.315-319 (1999)
- [9] Gajraj N.M., Nathanson M.H., Preventing pain during injection of propofol: the  
optimal dose of lidocaine, J. Clin. Anesth. 8(7), S.575-577 (1996)

- 
- [10] Ho C.M., Tsou M.Y., Sun M.S., Chu C.C., Lee T.Y., The optimal effective concentration of lidocaine to reduce pain on injection of propofol, *J. Clin. Anesth.* 11(4), S.296-300 (1999)
- [11] Yoshikawa T., Wajima Z., Inoue T., Ogura A., Ogawa R., Epidural an-esthesia with lidocaine reduces propofol injection pain, *Can. J. Anaesth.* 48(6), S.538-544 (2001)
- [12] Kaufke S., Krauel K., Einfluss von Lokalanästhetika auf die Teilchengröße von Propofol-Fettemulsionen, *Krankenhauspharmazie* 21(6), S.284-286 (2000)
- [13] Crommelin D.J.A., Sindelar R.D., *Pharmaceutical biotechnology: an introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists*, Routledge (Taylor & Francis Group), London, 2002
- [14] Weiner N., Martin F., Riaz M., Liposomes as a drug delivery system, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15(10), S.1523-1553 (1989)
- [15] Feinstein M.B., Volpi M., Perrie S., Makriyannis A., Sha'afi R.I., Mechanisms of Local Anesthetic Action on the Permeability of Erythrocytes, Leukocytes, and Liposomes Containing the Erythrocyte Anion Channel Protein, *Mol. Pharmacol.* 13, S.840-851 (1977)
- [16] Arias H.R., Role of local anesthetics on both cholinergic and serotonergic ionotropic receptors, *Neurosci. Biobehav. R.* 23, S.817-843 (1999)
- [17] Bueger A., Wachter H., Hunnius' pharmazeutisches Wörterbuch, 7. Auflage Studienausgabe, Walter de Gruyter, New York, 1993
- [18] Steinhaus J.E., Pharmacology of intravenous local anesthetics, *Acta Anaesthesiol. Scand. Supplementum XXXVI*, S.71-78 (1969)
- [19] Le K.T., Maurice H., du Souich P., First-pass metabolism of lidocaine in the anesthetized rabbit. Contribution of the small intestine, *Drug Metab. Dispos.* 24, S.711-716 (1996)

- 
- [20] Ryan S.E., Baenziger J.E., A Structure-Based approach to nicotinic receptor pharmacology, *Mol. Pharmacol.* 55, S.348-355 (1999)
- [21] Simon A.M., Vree T.B., Gielen M.J.M., Booij L.H.D.J., Lagerwerf K.J., Comparison of the Effect and Disposition Kinetics of Lidocaine and ( $\pm$ ) Prilocaine in Patients Undergoing Axillary Brachial Plexus Block During Day Case Surgery, *Clin. Drug Invest.* 16 (3), S.241-250 (1998)
- [22] Kerr J.H., Intravenous regional analgesia, *Anaesthesia* 22(4), S.562-567 (1967)
- [23] Tuvemo T., Willdeck-Lund G., Smooth muscle effects of lidocaine, prilocaine, bupivacaine and etidocaine on the human umbilical artery, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 26(2), S.104-107 (1982)
- [24] Niesel H.C., Lokalanästhetika: Pharmakologie, Toxikologie und Anwendung, *Krankenhauspharmazie* 9(3), S.89-95 (1988)
- [25] Tucker G.T., Mather L.E., Lennard M.S., Gregory A., Plasma concentrations of the stereoisomers of prilocaine after administration of the racemate: implications for toxicity?, *Br. J. Anaesth.* 65, S.333-336 (1990) zitiert nach Siluveru M., Stewart J.T., Stereoselective determination of R(-)- and S(+)-prilocaine in human serum using a brush-type chiral stationary phase, solid-phase extraction and UV detection, *J. Pharmaceut. Biochem. Analysis* 15, S.389-392 (1996)
- [26] Essink-Tebbes C.M., Wuis E.W., Liem K.D., van Dongen R.T., Hekster Y.A., Safety of lidocaine-prilocaine cream application four times a day in premature neonates: a pilot study, *Eur. J. Pediatr.* 158 (5), S.421-423 (1999)
- [27] Nilsson A., Engberg G., Henneberg S., Danielson K., De Verdier C.H., Inverse relationship between age-dependent erythrocyte activity of methaemo-globin reductase and prilocaine-induced methaemoglobinaemia during infancy, *Br. J. Anaesth.* 64(1), S.72-76 (1990)

- 
- [28] Frey B., Kehrer B., Toxic methaemoglobin concentrations in premature infants after application of a prilocaine-containing cream and peridural prilocaine, *Eur. J. Pediatr.* 158(10), S. 785-788 (1999)
- [29] Wagner F., Mißler B., Kombiniertes Ischiadikus/ 3-in-1-Block Prilocain 500 mg vs. 650 mg, Comparison of 500 versus 650 mg prilocaine for combined 3-in-1/sciatic nerve block, *Anaesthesist* 46 (3), S.195-200 (1997)
- [30] Court M.H., Hay-Kraus H.L., Hill D.W., Kind A.J., Greenblatt D.J., Propofol Hydroxylation by Dog Liver Microsomes: Assay Development and Dog Breed Differences, *Drug Metab. Dispos.* 27, S.1293-1299 (1999)
- [31] Audibert G., Saunier C.G., du Souich P., In vivo and in vitro effect of cimetidine, inflammation, and hypoxia on propofol kinetics, *Drug Metab. Dispos.* 21, S.7-12 (1993)
- [32] Jones M.V., Harrison N.L., Pritchett D.B., Hales T.G., Modulation of the GABAA receptor by propofol is independent of the gamma subunit, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, S.962-968 (1995)
- [33] James R., Glen J.B., Synthesis, biological evaluation, and preliminary structure-activity considerations of a series of alkylphenols as intravenous anesthetic agents, *J. Med. Chem.* 23(12), S.1350-1357 (1980)
- [34] Krasowski M.D., Jenkins A., Flood P., Kung A.Y., Hopfinger A.J., Harrison N.L., General anesthetic potencies of a series of propofol analogs correlate with potency for potentiation of gamma-aminobutyric acid (GABA) current at the GABA(A) receptor but not with lipid solubility, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297(1), S.338-351 (2001)
- [35] Yang C.-H., Shyr M.-H., Kuo T.B.J., Tan P.P.C., Chan S.H.H., Effects of propofol on nociceptive response and power spectra of electroencephalographic and systemic arterial pressure signals in the rat: correlation with plasma concentration, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, S.1568-1574 (1995)

- 
- [36] Langeron O., Vivien B., Paqueron X., Saillant G., Riou B., Coriat P., Lille F., Effects of propofol, propofol-nitrous oxide and midazolam on cortical somatosensory evoked potentials during sufentanil anaesthesia for major spinal surgery, *Br. J. Anaesth.* 82, S.340-345 (1999)
- [37] Aarts L., van der Hee R., Dekker I., de Jong J., Langemeijer H., Bast A., The widely used anesthetic propofol can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant, *FEBS Let.* 357, S.83-85 (1995)
- [38] Eriksson O., Pollesello P., Saris N.E., Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anaesthetic propofol, *Biochem. Pharmacol.*, S.391-393 (1992)
- [39] Jost U., Dörsing C., Jahr C., Hirschauer M., Propofol und postoperative Übelkeit und/oder Erbrechen, *Anaesthesist* (9), S.776-782 (1997)
- [40] Rüscher D., Happe W., Wulf H., Postoperative Übelkeit und postoperatives Erbrechen nach Strabismuschirurgie bei Kindern, *Anaesthesist* (2), S.80-88 (1999)
- [41] Eberhart L.H.J., Bernert S., Wulf H., Geldner G., Pharmakoökonomische Modelle zur Kostenberechnung dargestellt am Beispiel einer Studie zur Prophylaxe von Übelkeit und Erbrechen in der postoperativen Phase, *Anaesthesist* 51, S.475-481 (2002)
- [42] Borgeat A., Wilder-Smith O.H.G., Wilder-Smith C.H., Forni M., Suter P.M., Propofol improves patient comfort during cisplatin chemotherapy, *Oncology* 50, S.456-459 (1993)
- [43] Grundmann U., Risch A., Kleinschmidt S., Klatt R., Larsen R., Remifentanyl-Propofol-Anästhesie bei Bandscheibenoperationen: ein Vergleich mit einer Desfluran-N<sub>2</sub>O-Inhalationsanästhesie, *Anaesthesist* 47, S.102-110 (1998)
- [44] Picard P., Tramer M.R., Prevention of pain on injection with propofol: A quantitative systemic review, *Anesth. Analg.* 90, S.963-969 (2000)



- 
- [45] Tan C.H., Onsiong M.K., Pain on injection of propofol, *Anaesthesia* 53, S.468-476 (1998)
- [46] Eriksson M., Engleson S., Hartvig P., Acidified propofol retains its anaesthetic potency after storage, *European Journal of Anaesthesiology* 16, S.166-168 (1999)
- [47] Doenicke A.W., Roizen M.F., Rau J., Kellermann W., Babl J., Reducing pain during propofol injection: The role of the solvent, *Anesth. Analg.* 82, S.472-474 (1996)
- [48] Scott R.P., Saunders D.A., Norman J., Propofol: clinical strategies for preventing the pain of injection, *Anaesthesia* 43(6), S.492-494 (1988)
- [49] Nakane M., Iwama H., A potential mechanism of propofol-induced pain on injection based on studies using nafamostat mesilate, *Br.J.Anaesth.* 83(3), S.397-404 (1999)
- [50] Iwama H., Nakane M., Ohmori S., Kaneko T., Kato M., Watanabe K., Okuaki A., Nafamostat mesilate, a kallikrein inhibitor, prevents pain on injection with propofol, *Br. J. Anesth.* 81, S.963-964 (1998)
- [51] Latrofa A., Trapani G., Altomare C., Serra M., Sanna E., Biggio G., Liso G., Water-soluble prodrugs of the anesthetic agent propofol: In vitro and in vivo evaluation of cyclic amino acid esters, 4<sup>th</sup> World Meeting, APV, Florence 2002
- [52] Small D.M., *Handbook of Lipid Research Vol. 4, The Physical Chemistry of Lipids*, New York, (1986)
- [53] von Bruchhausen F., *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 5.Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1990
- [54] Bartholomé E., Biekert E., Hellmann H., Ley H., *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, 4. Neubearbeitete Auflage, Band 16, Weinheim, 1978
- [55] Pardun H., *Die Pflanzenlecithine*, Verlag für Chemische Industrie H. Ziolkowsky KG, Augsburg, (1988)

- 
- [56] Memoli A., Annesini M.C., Petralito S., Surfactant-induced leakage from liposomes: a comparison among different lecithin vesicles, *Int. J. Pharm.* 184, S.227-235 (1999)
- [57] Betagerie G.V., Jenkins S.A., Parsons D.L., Liposome drug delivery systems, „Technomik“ publikation, Technomic Publishing Company Inc., Basel, 1993
- [58] Raab W. und Kindl U. unter Mitarb. von Daniels R., *Pflege-kosmetik: ein Leitfaden*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Govi Verlag, Frankfurt (Main), 1997
- [59] Röding J., Ghyczy M., Beeinflußung der Hautfeuchtigkeit durch Liposomen; Stabilisierung von pflegenden Ölen und lipophilen Wirkstoffen mit Liposomen, *S.Ö.F.W.* 117 (10), S.372-378 (1991)
- [60] Schramlová J., Blažek K., Bartáčková M., Otová B., Mardešičová L., Žižkovský V., Hulínská D., Electron Microscopic Demonstration of the Penetration of Liposomes through Skin, *Folia Biol-Prague* 43, S.165-169 (1997)
- [61] Mastellone I., Polichetti E., Gres S., de la Maisonneuve C., Domingo N., Marin V.V., Lorec A.-M., Farnarier C., Portugal H., Kaplanski G., Chanussot F Dietary soybean phosphatidylcholines lower lipidemia: mechanisms at the levels of intestine, endothelial cell, and hepato-biliary axis, *J. Nutr. Biochem.* 11(9), S.461-466 (2000)
- [62] Brown G. H., Crooker P.P., Liquid crystals: A colorful state of matter, *C&EN*, S.24-37 (1983)
- [63] Pershan P.S., Amphiphilic Molecules and Liquid Crystals, *J. Phys.-Paris* 40 (4), S.C3-423-C3-432 (1979)
- [64] Bauer K.H., Frömming K.-H., Führer C., *Pharmazeutische Technologie*, 4.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1993
- [65] Müller-Goymann C.C., Flüssigkristalline Systeme in der Pharmazeutischen Technologie, *PZ Prisma* 5, S.129-140 (1998)

- 
- [66] van Djick P.W.M., de Kruijff B., Verkleij A.J., van Deenen L.L.M., de Gier J., Comparative studies on the effect of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixture with posphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta* 512, S.84-96 (1978)
- [67] Isrealachvili J.N., Mitchell D.J., A model for the packing of lipids in bilayer membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 389, S.13-19 (1975)
- [68] Isrealachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W., Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 470, S.185-201 (1977)
- [69] Tanford C., The hydrophobic effect: formulation of micelles and biological membranes, Wiley-Interscience, New York, 1980
- [70] Lichtenberger D., Barenholz Y., Liposomes: Preperation, Character-ization, and Preservation, *Meth. Biochem. Anal.* 33, S.338-462 (1988)
- [71] Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipis, *J. Mol. Biol.* 13, S.238-252 (1965)
- [72] Sessa G., Weismann G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.* 9, S.310-318 (1968)
- [73] Röding J., Naptide<sup>®</sup> II: New easy liposome system, *S.Ö.F.W.* 116 (14), S.509-515 (1990)
- [74] Stricker H., Liposomale Wirkstoffträger, *D. A. Z.* 126(22), S.1159-1162 (1986)
- [75] Schreier H., Liposomen - ein neuartiger Arzneistoffträger, *Pharmazie in userer Zeit* 11 (4), S.97-108 (1982)
- [76] Hockertz S., Liposomen und liposomale Technologie, *Pharm. Ind.* 57 (10), S.861-866 (1995)

- 
- [77] Nakagaki M., Komatsu H., Handa T., Microenvironment around thiocarbocyanine dyes in lysolecithin micelles, surfactant micelles and lecithin liposomal membranes, *Chem. Pharm. Bull.* 34(11), S.4486-4493 (1986)
- [78] Lopez-Berestein G., Liposomes as carriers of antimicrobial agents, *Antimicrob. Agents Ch.* (5), S.675-678 (1987)
- [79] McAllister S.M., Alpar H.O., Brown M.R.W., Antimicrobial properties of liposomal polymyxin B, *J. Antimicrob. Chemoth.* 43, S. 203-210 (1999)
- [80] Schumacher I., Margalit R., Liposome-encapsulated ampicillin: Physicochemical and antibacterial properties, *J. Pharm. Sci.* 86 (5), S. 635-641 (1997)
- [81] Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D., Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, *Pharmacol. Rev.* 51 (4), S.691-744 (1999)
- [82] Moonis M., Ahmad I., Bachhawat B.K., Liposomal hamycin in the control of experimental aspergillosis in mice: effect of phosphatidic acid with and without cholesterol, *J. Antimicrob. Chemoth.* 31, S.569-579 (1993)
- [83] Mišik V., Staško A., Gergel D., Ondriaš K., Spin-trapping and antioxidant properties of illuminated and nonilluminated nifedipine and nimodipine in heart homogenate and model system, *Mol. Pharmacol.* 40, S.435-439 (1991)
- [84] Schneider T., Sachse A., Leike J., Rößling G., Schmidtgen M., Drechsler M., Brandl M., Surface modification of continuously contrast-carrying liposomes: effect on their physical properties, *Int. J. Pharm.* 132, S.9-21 (1996)
- [85] Lee K.-D., Oh Y.-K., Portnoy D.A., Swanson J.A., Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*, *J. Biol. Chem.* 271 (13), S.7249-7252 (1996)

- 
- [86] Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D. , Introduction of Liposome-encapsulated SV 40 DNA into Cells, *J. Biol. Chem.* 255 (21), S.10431-10435 (1980)
- [87] Li F., Michalek S.M., Dasanayake A.P., Li Y., Kirk K., Childers N.K., Intranasal immunization of humans with *Streptococcus mutans* antigens, *Oral Microbiol. Immun* 18, S.271-277 (2003)
- [88] Grant G.J., Piskoun B., Bansinath M., Intrathecal administration of liposomal neostigmine prolongs analgesia in mice, *Acta Anesthesiol. Scand.* 46, S.90-94 (2002)
- [89] Joshi M., Misra A., Disposition kinetics of ketotifen from liposomal dry powder for inhalation in rat lung, *Clin. Exp. Pharmacol. P.* 30, S.153-156 (2003)
- [90] Monem A.S., Ali F.M., Ismail M.W., Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCl in normal and glaucomatous rabbits, *Int. J. Pharm.* 198(1), S.29-38 (2000)
- [91] Pavelic Z., Skalko-Basnet N., Schubert R., Liposomal gels for vaginal drug deliver, *Int. J. Pharm.* 219(1-2), S.139-149 (2001)
- [92] Egbaria K., Weiner N., Liposomes as a topical drug delivery system, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 5, S.287-300 (1990)
- [93] Grant G.J., Piskoun B., Bansinath M., Analgesic Duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice, *Clin. Exp. Pharmacol. P.* 30, S.966-968 (2003)
- [94] Vingerhoeds M.H., Storm G., Crommelin J.A., Immunoliposomes in vivo, *Immunomethods* 4, S.259-272 (1994)
- [95] Poste G., Liposome targetting in Vivo: Problems and oppertunities, *Biol. Cell* 47, S.19-38 (1983)

- 
- [96] Djordjevich L., Ivankovich A.D., Synthetic erythrocytes, Crit. Rev. Ther. Drug 6(2), S.131-162 (1989)
- [97] de Haan A., Tomee J.F.C., Huchshorn J.P., Wilschut J., Liposomes as an immunoadjuvant system for stimulation of mucosal and systemic antibody response against inactivated measles virus administered intranasally to mice, Vaccine 13(14), S.1320-1324 (1995)
- [98] Fries L.F., Daniel M., Gordon D.M., Richards R.L., Egan J.E., Hollingdale M.R., Gross M., Silverman C., Alving C.R., Liposomal malaria vaccine in humans: A safe and potent adjuvant strategy, P. Natl. Acad. Sci. USA, S.358-362 (1992)
- [99] Citernesi U., Sciacchitano M., Phospholipid/ Active Ingredient Complexes, Cosmet. Toiletries 110, S.57-68 (1995)
- [100] Crommelin D.J.A., Grit M., Talsma H., Zuidam N.J., Liposomes as carriers for drugs and antigens: Approaches to preserve their long term stability, Drug Dev. Ind. Pharm. 20(4), S.547-556 (1994)
- [101] Schütze, W., Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1998
- [102] Taylor K.M.G., Morris R.M., Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes, Thermochim. Acta 248, S.289-301 (1995)
- [103] Hanpft R., Untersuchungen zur Pharmakoninduzierten Phasentransitionsveränderungen an künstlichen Phospholipidmembranen, Dissertation Universität Kiel, 1987
- [104] Chapmann D., Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes, Q. Rev. Biophys. 8 (2), S.185-235 (1975)
- [105] Department of Research (Liposome Technology), On the Thermodynamic Stability of Liposomes, J. Colloid Interf. Sci. 140 (1), S.302-304 (1990)

- 
- [106] Spillecke F. and Neumann E., Investigation of liposomes and vesicles reconstituted with acetylcholine receptor employing percoll density gradient centrifugation, Neuroreceptors, Walter de Gruyter & Co., Berlin, S.243-252 (1982)
- [107] Gruner S.M., Lenk R.P., Janoff A.S., Ostro M.J., Novel multilayered lipid vesicles: Comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles, Biochemistry-US 24, S. 2833-2842 (1985)
- [108] Rubas W., Schreier H., Liposomen: Fortschritte in Herstellungs-Technologie und Therapie, Pharmazie in unserer Zeit 20 (6), S.255-270 (1991)
- [109] Dörfler H.-D., Görner G., Bendzko P., Kalorimetrische Untersuchungen an peptidmodifizierten Liposomen, Pharmazie 50, S.553-557 (1995)
- [110] Helm C.A., Israelvili J.N., McGuiggan P.M., Molecular Mechanisms and Forces Involved in the Adhesion and Fusion of Amphiphilic Bilayers, Sciences 246, S.919-922 (1989)
- [111] Brooks G., Formulating with liposomes, Manufacturing Chemist, S.36-39 (1989)
- [112] Hope M.J., Bally M.B., Mayer L.D., Janoff A.S., Cullis P.R., Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles, Chem. Phys. Lipids 40, S.89-107 (1986)
- [113] Babincova M., Microwave-controlled drug release from magnetoliposomes, Pharmazie 50, S.702-703 (1995)
- [114] Clerc S., Barenholz Y., Loading of amphiphatic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients, Biochim. Biophys. Acta 1240, S.257-265 (1995)
- [115] Cohen B.E., The Permeability of Liposomes to Nonelectrolytes I. Activation Energies for Permeation, J. Membrane Biol. 20, S.205-234 (1975)

- 
- [116] Kronberg B., Dahlman A., Carlfors J., Karlsson J., Artursson P., Preparation and evaluation of sterically stabilized liposomes: Colloidal stability, serum stability, macrophage uptake, and toxicity, *J. Pharm. Sci.* 79(8), S.667-671 (1990)
- [117] Nawroth T., Dose K., Conrad H., Koch H., Ringsdorf H., Neutron small angle scattering of monomeric and polymeric liposomes from synthetic lipids, *Physica B* 156 & 157, S.496-498 (1989)
- [118] Morris C., Finkelstein M.C., Weissmann G., Enzyme replacement via liposomes Variations in lipid composition determine liposomal integrity in biological fluids, *Biochim. Biophys. Acta* 587, S.202-216 (1979)
- [119] Blume G., Cevc G., Liposomes for sustained drug release in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1029, S.91-97 (1990)
- [120] Szebeni J., The interaction of liposomes with the complement system, *Crit. Rev. Ther. Drug* 15(1), S.57-88 (1998)
- [121] Senior J.H., Fate and behavior of liposomes in vivo: A review of controlling factors, *Crit. Rev. Ther. Drug* 3(2), S.123-193 (1987)
- [122] Ishida T., Harashima H., Kiwada H., Liposome clearance, *Bioscience Rep.* 22(2), S.197-224 (2002)
- [123] Gütt S., Rheologische in-vivo Untersuchungen an der menschlichen Haut mit nicht-invasiven Verfahren, Dissertation Universität Hamburg, 1998
- [124] Rote Liste<sup>®</sup> 2000, Rote Liste<sup>®</sup> Service GmbH, Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 2000
- [125] Rhone-Poulenc Rorer, Analysen-Zertifikat Phospholipon<sup>®</sup> 90 G
- [126] Fachinformation Propofol 1 % Fresenius, Fresenius Kabi, Stand der Information 03.2003



- 
- [127] Gebrauchsinformation Propofol 1 % Fresenius, Fresenius Kabi, Stand der Information 01.2000
- [128] PCS in 30 Minuten, Malvern Instruments
- [129] Lakowicz J.R., Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Press, New York, 1983
- [130] Zhang X., Jackson J.K., Burt H.M., Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique, J. Biochem. Bioph. Meth. 31, S.145-150 (1996)
- [131] Westesen K., Beitrag zur Strukturaufklärung eines arzneistoffhaltigen, hochkonzentrierten Tensidsysteme und ausgewählte Verdünnungen, Dissertation Universität Braunschweig, 1988
- [132] Stoye I., Schröder K., Müller-Goymann C.C., Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles – physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum, Eur. J. Pharm. Biopharm. 46, S.191-200 (1998)
- [133] Lilley E.M.M., Isert P.R., Carasso M.L., Kennedy R.A., The effect of the addition of lignocaine on propofol emulsion stability, Anaesthesia 51, S.815-818 (1996)
- [134] Parfitt K, Martindale: the complete drug reference, 30, Pharmaceutical Press, London, 1993
- [135] Parfitt K, Martindale: the complete drug reference, 32, Pharmaceutical Press, London, 1999
- [136] Woolfson D., MacCafferty D., Percutaneous local anaesthesia, Ellis Horwood, New York, 1993

- 
- [137] Attwood D., Fletcher P., Self-association of local anaesthetic drugs in aqueous solution, *J. Pharm. Pharmacol.* 38, S.494-498 (1986)
- [138] Herr D.L., Kelly K., Hall J.B., Ulatowski J., Fulda G.J., Cason B., Hickey R., Nejman A.M., Zaloga G.P., Teres D., Safety and efficacy of propofol with EDTA when used for sedation of surgical intensive care unit patients, *Intens. Care Med.* 26, S.452-462 (2000)
- [139] Barr J., Zaloga G.P., Haupt M.T., Weinmann M., Murray M.J., Bandi V., Teres D., Cation metabolism during propofol sedation with and without EDTA in patients with impaired renal function, *Intens. Care Med.* 26, WS.433-442 (2000)
- [140] Bauer M., Megret C., Lamure A., Lacabanne C., Fauran-Clavel M.-J., Differential scanning calorimetry study of the interaction of antidepressant drugs, noradrenalin, and 5-hydroxytryptamine with a membrane model, *J. Pharm. Sci.* 79(19), S.897-901 (1990)
- [141] Ueda I., Chiou J.-S., Krishna P.R., Kamaya H., Local anesthetics destabilize lipid membranes by breaking hydration shell: infrared and calorimetry studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1190, S.421-429 [1994]
- [142] Baade St., Mueller-Goymann C.C., Lidocaine and soyasterol-PEG-16-ether-investigations on the interaction between an amphiphilic drug and a nonionic surfactant in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.* 272 S.228-235 (1994)
- [143] Schütze W., Müller-Goymann C.C., Phase transformation of a liposomal dispersion into a micellar solution induced by drug-loading, *Pharm. Res.* 15 (4), S.538-542 (1998)
- [144] Kane S.A., Floyd S.D., Interaction of local anesthetics with phospholipids in Langmuir monolayers, *Phys. Rev. E* 62(6), S.8400-8408 (2000)
- [145] Ma J.Y.C., Ma J.K.H., Weber K.C., Fluorescence studies of the binding of amphiphilic amines with phospholipids, *J. Lipid Res.* 26, S.735-744 (1985)

- 
- [146] Joshi U.M., Kodavanti P.R.S., Coudert B., Dwyer T.M., Mehendale H.M., Types of interaction of amphiphilic drugs with phospholipid vesicles, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246(1), S.150-157 (1988)
- [147] Bouwstra J.A., Gooris G.S., Bras W., Talsma H., Small angle X-ray scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles, *Chem. Phys. Lipids*, 64, 83-98 (1993).
- [148] Müller M., Mackeben S., Müller-Goymann C.C., Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics, *Int. J. Pharm.* 274, S.139-148 (2004)
- [149] Laggner P., Glatter O., Müller K., Kratky O., Kostner G., Holasek A. The Lipid Bilayer Structure of the Abnormal Human Plasmaprotein X, *Eur. J. Biochem.* 77, S. 165-171 (1977)
- [150] Glatter, O. and Kratky, O., *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, 1982
- [151] Nagarsenker M.S., Joshi A.A., Preparation, characterization and evaluation of liposomal dispersions of lidocaine, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23(12), S.1159-1165 (1997)
- [152] Crowe L.M., Crowe J.H., Rudolph A., Wormersley C., Appel L., Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose, *Arch. Biochem. Biophys.* 242(1), S. 240-247 (1985)
- [153] Hinch D.K., Hellwege E.M., Heyer A.G., Crowe J.H., Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying, *Eur. J. Biochem.* 267, S.535-540 (2000)
- [154] Hanawa T, Muramatsu E., Asakawa K., Suzuki M., Tanaka M, Kawano K., Seki T., Juni K., Nakajima S., Investigation of the release behavior of diethylhexyl phthalate from the polyvinyl-chloride tubing for intravenous administration, *Int. J. Pharm.* 210, S.109-115 (2000)

- 
- [155] Marin M.L., Lopez J., Sanchez A., Vilaplana J., Jimenez A., Analysis of potentially toxic phthalate plasticizers used in toy manufacturing, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, S.68-73 (1998)
- [156] Kikuchi H., Yamauchi H., Hirota S., A polyol dilution method for mass production of liposomes, *J. Lipid. Res.* 4(1), S.71-91 (1994)
- [157] Jizomoto H., Hirano K., Encapsulation of drugs by lyophilized empty dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: Effect of Calcium ion, *Chem. Pharm. Bull.* 37(11), S.3066-3069 (1989)
- [158] Yachi K., Harashima H., Kikuchi H., Sudo R., Yamauchi H., Ebihara K., Matsuo H., Funato K., Kiwada H., Biopharmaceutical evaluation of the liposomes prepared by rehydration of freeze-dried empty liposomes (FDELs) with an aqueous solution of a drug, *Biopharm. Drug Dispos.* 17, S. 589-605 (1996)
- [159] Lee J.H., Shim C.K., Lee M.H., Kim S.K., Enhanced entrapment of isopropamide iodide in liposomes by ion-pairing with sodium taurodeoxy-cholate, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14(4), S.451-463 (1988)
- [160] Lambert O., Letellier L., Gelbart W.M., Rigaud J.-L., DNA delivery by phage as a strategy for encapsulating toroidal condensates of arbitrary size into liposomes, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97(13), S.7248-7253 (2000)
- [161] Bolotin E.M., Cohen R., Bar L.K., Emanuel N., Ninio S., Lasic D.D., Barenholz Y., Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandoliposomes, *J. Lipid. Res.* 4(1), S.455-479 (1994)
- [162] Vemuri S., Rhodes C.T., Development and characterization of a liposome preparation by a pH-gradient method, *J. Pharm. Pharmacol.* 46, S.778-783 (1994)
- [163] Kulkarni S.B., Betagerie G.V., Singh M., Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes, *J. Microencapsul.* 12(3), S.229-246 (1995)

- 
- [164] Siekmann B., Westesen K., Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids, *Pharm. Pharmacol. Letter* 1, S. 123-126 (1992)
- [165] Jousma H., Talsma H., Spies F., Joosten J.G.H., Junginger H.E., Crommelin D.J.A., Characterisation of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers, *Int. J. Pharm.* 35, S.263-274 (1987)
- [166] Boulanger Y., Schreier S., Smith I.C.P., Molecular details of anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, *Biochemistry-US* 20, S.6824-6830 (1981)
- [167] Altomare C., Trapani G., Latrofa A., Serra M., Sanna E., Biggio G., Liso G., Highly water-soluble derivatives of the anesthetic agent propofol: in vitro and in vivo evaluation of cyclic amino acid ester, *Eur. J. Pharm.Sci.* 20, S. 17-26 (2003)

---

**Lebenslauf**

Name:	Markus Müller	
Geburtstag / -ort:	16. März 1973 in Bad Karlshafen	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1979 – 1981	Katholische Grundschule Jülich
	1981 – 1983	Grundschule Kirchohsen
	1983 – 1985	Orientierungsstufe Kirchohsen
	1985 – 1992	Viktoria-Luise Gymnasium Hameln
		Abitur (Note: 1,6)
Wehrdienst	1992 – 1993	
	01.10.1992 – 31.12.1992	2./Nachschubbataillon 804 in Lingen
	01.01.1993 – 30.09.1993	Stab/StabsKompanie WBK II
Ausbildung	1993 – 1997	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Braunschweig
	01.12.1997 – 31.05.1998	Erasmusstudent an der Universitaire Instelling Antwerpen
	26.08.1998	Diplom
	06.1998 – 09.1999	Praktische Ausbildung
		(unterbrochen 02.09.1998 – 30.06.1999 durch Krankenhausaufenthalte in Bad Pyrmont, Hildesheim, Hess. Oldendorf)
	20.12.1999	Approbation als Apotheker
	01.01.2000 – 31.12.2004	Promotion in der Abteilung Pharmazeutische Technologie an der Technischen Universität Braunschweig
Berufstätigkeit:	01.01.2005 – 28.02.2005	Arbeitssuchend
	01.03.2005 – 31.08.2005	Projektbearbeitung an der Technischen Universität Braunschweig
	Seit 01.09.2005	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)